UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Danielle Karoline Silva do Vale Castro

Reconhecimento molecular de septinas: estudos da interface entre SEPT7 e SEPT12

São Carlos

2018

Danielle Karoline Silva do Vale Castro

Reconhecimento molecular de septinas: estudos da interface entre SEPT7 e SEPT12

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Richard Charles Garratt

São Carlos

2018

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.

Assinatura: *Danielle K. S. do V. Castro*
Data: 16/07/2018

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Castro, Danielle Karoline Silva do Vale

Reconhecimento molecular de septinas: estudos da interface entre SEPT7 e SEPT12 / Danielle Karoline Silva do Vale Castro. — São Carlos, 2018.
111 f.

Dissertação (Mestrado em Química Orgânica e Biológica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2018.
Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Richard Charles Garratt

1. Proteínas. 2. Septinas. 3. Biologia estrutural. 4. GTPases. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Richard Charles Garratt, pela oportunidade de trabalho, confiança e orientação. Serei eternamente grata por todos os ensinamentos, experiências e conduta como orientador, um exemplo de profissional e pessoa.

À Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo e Dr. Humberto D’Muniz Pereira pelas contribuições, discussões e ideias que auxiliaram no desenvolvimento do trabalho.

À minha família, em especial aos meus pais, Vanilde e Ailton, e irmão, Sérgio, cujo apoio incondicional e amor me inspiram a buscar meus sonhos.

Ao meu noivo, Paulo, cujo companheirismo e amor tornam mais leves e felizes os meus dias. Agradeço por todos os momentos difíceis no laboratório em que você estava presente, me fazendo companhia, ajudando ou dando conselhos.

A todos os meus amigos que nestes dois anos estiveram presentes fisicamente ou não, aconselhando, torcendo e proporcionando momentos de felicidade e distração.

Aos grupos de Biofísica Molecular e Biologia Estrutural. Aos funcionários, Isabel, Fernando, Rafael e Susana por auxiliarem na rotina de trabalho e, em especial, à Andressa cujas discussões e ajuda para utilizar equipamentos foram imprescindíveis para a realização deste trabalho. Aos alunos, Diego, Evérton, Higor, Marcela, Marina, Nicolau, Patrícia, Raíssa, Raphael e Sinara pela colaboração e momentos de descontração e discussão de ideias.

Ao programa de pós-graduação em Química do Instituto de Química de São Carlos (IQSC) pelo suporte técnico e acadêmico. Ao Instituto de Física de São Carlos (IFSC) pela infraestrutura disponibilizada. Pelo financiamento do projeto de pesquisa agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao processo nº 2016/19734-2, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

A todos que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste projeto, o meu muito obrigada.

Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less. Marie Curie

RESUMO

A família das septinas caracteriza-se pela capacidade de ligar nucleotídeos de guanina e de se associarem formando filamentos. Diversas funções biológicas têm sido reportadas para esses filamentos e sua dissociação pode estar relacionada a patologias. A septina 12 humana, expressa especificamente em testículos, foi identificada em filamentos que compõem o *annulus* do espermatozoide, cuja integridade está relacionada com a morfologia deste. Embora muitos estudos tenham sido reportados, vários aspectos das bases moleculares e fisiológicas de sua função e automontagem permanecem desconhecidos. Neste trabalho, procurou-se obter informações estruturais para o domínio de ligação ao nucleotídeo da SEPT12 (SEPT12G), do mutante SEPT12G^{T89M} e do heterodímero SEPT7-SEPT12. A expressão destas proteínas foi realizada em células de *E. coli* da linhagem Rosetta(DE3) pelos vetores de expressão pET28a(+) e pETDuet-1. As etapas de purificação foram cromatografia de afinidade e exclusão por tamanho molecular. A proteína SEPT12G foi submetida à avaliação do estado oligomérico, fluorescência intrínseca, ensaios de conteúdo de nucleotídeos, atividade GTPásica e transição térmica. O heterodímero SEPT7-SEPT12 foi submetido à avaliação do estado oligomérico e conteúdo de nucleotídeos. Ensaio de cristalização foram realizados para todas as proteínas. A coleta de dados realizada na linha I24 do *Diamond Light Source* (Didcot, Inglaterra) resultou em conjuntos de dados de alta resolução para a SEPT12G, SEPT12G^{T89M} e baixa resolução para a SEPT7NGc. Os estudos biofísicos mostraram que a SEPT12G foi obtida em sua forma nativa ou, seja, capaz de ligar-se e hidrolisar o nucleotídeo GTP e que o heterodímero obtido apresentou ambas as proteínas. As estruturas cristalográficas foram resolvidas e permitiram realizar observações importantes para o grupo I das septinas humanas (SEPT3, SEPT9 e SEPT12). Para a SEPT12 pôde-se observar como a mudança que ocorre no motivo G4 pode alterar a estabilidade da interface G. No contexto do grupo I esta estrutura permitiu concluir que todas as proteínas deste subgrupo podem formar duas interfaces NC, dos tipos aberta e fechada. Além disso, reforçou a observação da orientação diferencial da hélice $\alpha 5'$, cuja função ainda não está esclarecida, mas sem dúvidas é um diferencial que caracteriza este grupo, possivelmente relacionado com a ancoragem da região polibásica na conformação aberta. A estrutura cristalográfica do mutante SEPT12^{T89M} permitiu observar que a mutação levou a uma alteração na primeira esfera de coordenação do íon Mg^{2+} , mudança que interrompe o mecanismo do *switch* universal e deixa a proteína cataliticamente inativa. Por fim, o estudo cristalográfico do complexo entre a SEPT12 e SEPT7 não foi possível, uma vez que todas

as tentativas resultaram em cristais contendo apenas a SEPT7, o que pode ser consequência da precipitação da SEPT12 ou da condição de cristalização utilizada, que desestabiliza o heterodímero.

ABSTRACT

The septin family of proteins is characterized by their ability to bind guanine nucleotides and associate into filaments. Several biological functions have been reported for these filaments and their dissociation may be related to pathologies. Human septin 12 is specifically expressed in testes and has been identified in filaments that form the sperm annulus, whose integrity is related to its morphology. Although many studies have been reported, the molecular and physiological bases of septin filament function and self-assembly have yet to be completely elucidated. This study aims to obtain structural information for the nucleotide binding domain of SEPT12 (SEPT12G), the SEPT12G^{T89M} mutant and the SEPT7-SEPT12 heterodimer. Expression of these proteins was performed in *E. coli* Rosetta(DE3) strain using the pET28a (+) and pETDuet-1 expression vectors. Purification was performed by affinity and size exclusion chromatography. The SEPT12G protein was submitted to an evaluation of its oligomeric state, intrinsic fluorescence, nucleotide content, GTPase activity and thermal transition. The oligomeric state and nucleotide content of SEPT7-SEPT12 was also evaluated. Crystallization assays were performed for all proteins. Data collection on line I24 of the Diamond Light Source (Didcot, England) resulted in high-resolution data sets for SEPT12G and SEPT12G^{T89M} but only low resolution data for the SEPT7NGc. Biophysical studies showed that SEPT12G was obtained in its native form or, in other words, capable of binding and hydrolyzing GTP and that the purified heterodimer presented both proteins. The crystallographic structures were solved by molecular replacement allowing the identification of features characteristics of the group I septins (SEPT3, SEPT9 and SEPT12). The structure also confirmed that all the proteins of this group are able to form two different NC interfaces: open and closed. In addition, it reinforced the observation that the $\alpha 5'$ helix assumes a different orientation, whose function has not yet been clarified, but without doubt is a characteristic of this group which may be related to anchoring the polybasic regions whilst in the open conformation. The SEPT12^{T89M} mutant crystal structure shows that the first shell coordination of the Mg²⁺ ion is altered, leading to an interruption of the universal switch mechanism and a consequent lack of catalytic activity. Finally, structural studies of the interaction between SEPT12 and SEPT7 were not possible, since all attempts resulted in crystals containing only SEPT7. This may be a consequence of SEPT12 precipitation or the crystallization condition used, destabilizing the heterodimeric interface.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Heterofilamentos identificados durante o brotamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.** **A)** Micrografia ótica da levedura termosensível contendo a mutação no gene *cdc3*. Pode-se observar que na temperatura restritiva, que nesse experimento foi de 36 °C, as células filhas não se separam das células mães, formando células multinucleadas; **B)** Micrografia eletrônica de transmissão de uma célula em brotamento. Em destaque os filamentos observados; **C)** Micrografia de fluorescência destacando a localização das septinas durante a divisão celular. Inicialmente elas se organizam em um anel planar, conforme o processo de brotamento se inicia, os filamentos de septinas se estendem e passam a ter uma forma de ampulheta. Por fim, o filamento de septinas se divide e as células ficam com um anel planar de septinas. 22
- Figura 2 - Representação das estruturas compostas por septinas em diferentes processos biológicos.** Exemplo da localização dos filamentos de septinas nos processos de citocinese, estruturas para ancoramento de proteínas na membrana plasmática, organização do annulus em espermatozoides e formação de barreira de difusão. 24
- Figura 3 - Distribuição das septinas no corpo humano.** Em destaque os processos biológicos nos quais as septinas estão envolvidas para cada sistema do corpo humano..... 25
- Figura 4 - Caracterização e classificação das septinas de mamíferos.** **A)** Diagrama esquemático dos domínios presentes nas septinas. Em cinza o domínio N-terminal, cuja composição de aminoácidos é bastante variável; em amarelo a região polibásica; em verde o domínio central GTPase com os três motivos de interação com o nucleotídeos (G1, G2 e G3); em azul a região denominada SUE (septin unique element) e, por fim, em laranja o C-terminal, muitas vezes formando um domínio coiled-coil, mas com sequência e comprimento bastante variáveis ao longo dos grupos; **B)** Diagramas esquemáticos dos domínios presentes nas septinas, de acordo com a classificação em grupos. 27
- Figura 5 - Estrutura do complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7.** Nesta figura estão representadas as interfaces de interação denominadas de NC e G entre as septinas. As subunidades em cinza, nas extremidades da figura, correspondem à possibilidade de extensão do filamento, devido à adição de outros hexâmetros nessa posição. As setas na parte superior da figura indicam as posições e orientações dos domínios coiled-coil. Os nucleotídeos associados estão representados (GTP e GDP). 29

Figura 6 - Modelo esquemático de complexos de septinas. A) baseados em hexâmetros; B) baseados em octômeros.....	30
Figura 7 - Mutações no domínio G da SEPT12 interrompem a formação dos filamentos. Ensaio de imunofluorescência de células de carcinoma embrionário testicular humano (NT2/D1) transfectadas com os plasmídeos que codificam a fusão das septinas com as proteínas GFP, FLAG e Myc (GFP-SEPT12, FLAG-SEPT7 e Myc-SEPT6) mostram os padrões subcelulares das septinas citadas e da SEPT2 endógena na presença da SEPT12 e dos mutantes SEPT12 ^{T89M} e SEPT12 ^{D197N} . A) SEPT12 selvagem; B) SEPT12 ^{T89M} ; C) SEPT12 ^{D197N}	31
Figura 8 - Modelos esquemáticos ilustrando o efeito da fosforilação da SEPT12 durante a formação do espermatozoide. A) Para a SEPT12 selvagem os anéis de septinas que compõem o annulus são formados no pescoço do espermatozoide e migram pelo axonema até atingir a junção entre a peça intermediária e a cauda do espermatozoide. B) Após a fosforilação da SEPT12, ela se dissocia dos heterocomplexos formados pelas proteínas SEPT7-SEPT6-SEPT2 e SEPT7-SEPT6-SEPT4, mas ainda é capaz de formar interações SEPT12-SEPT12, ocasionando deformações na morfologia.....	32
Figura 9 - Fragmentos amplificados durante a PCR. Em cinza estão representados as regiões amplificadas e em preto as regiões deletadas. A) Reação 1; B) Reação 2 e C) Reação 3.....	36
Figura 10 - Representação da interação entre a His-tag de uma biomolécula e o íon metálico imobilizado em uma matriz sólida.....	40
Figura 11 - Curva esperada para o experimento de DSC. Típico resultado para a desnaturação térmica de uma proteína. Os parâmetros obtidos no experimento são: temperatura de melting (T_m), variação da capacidade calorífica à pressão constante (ΔC_p) e a variação da entalpia (ΔH).	45
Figura 12 - Método de cristalização. Difusão de vapor: gota sentada.....	46
Figura 13 - Sequências codificantes do domínio G das variantes 1 e 2 da SEPT12. Alinhamento realizado com o auxílio da ferramenta de bioinformática Clustal Omega.....	52
Figura 14 - Clonagem dos DNAs referentes às variantes 1 e 2 da SEPT12G. Produtos obtidos nas reações de PCR: M) marcador 1 kb DNA Ladder (Promega); 1) produto da reação 1; 2) produto da reação 2; 3) produto da reação 3 e 4) produto da reação 4.	53
Figura 15 - Análise de restrição dos clones de SEPT12 em pET28a(+). Nos géis estão representados: M) marcador 1 kb DNA Ladder; 1) variante 2 e 2) variante 1.....	53

Figura 16 - Análise da expressão da SEPT12G. A) variante 1 e B) variante 2. SDS-PAGE 15 %: M) padrão de massa molecular; 1) proteínas totais de <i>E. coli</i> após a indução; 2) fração solúvel após lise e 3) fração insolúvel após lise.	54
Figura 17 - Análise da purificação da SEPT12G variante 2. No SDS-PAGE 15 % estão representados: M) padrão de baixa massa molecular; 1) proteínas totais de <i>E. coli</i> após indução; 2) fração solúvel após a lise; 3) pellet após a lise; 5) lavagem 1; 5) lavagem 2; 6) primeiro volume obtido na eluição com 150 mM de imidazol e 7) segundo volume na eluição.	55
Figura 18 - Avaliação do estado oligomérico da SEPT12G. A) Purificação da SEPT12G em cromatografia de exclusão molecular; B) Curva de calibração em coluna Superdex200; C) Análise das duas etapas de purificação em SDS-PAGE 15 %. No gel está representado: M) marcador de baixo peso molecular; 1) proteínas totais de <i>E. coli</i> antes da indução; 2) proteínas totais de <i>E. coli</i> após a indução; 3) fração solúvel após a lise; 4) fração insolúvel após a lise; 5) proteína que não ligaram à resina de afinidade; 6) lavagem 1; 7) lavagem 2; 8) eluição em cromatografia de afinidade; 9) eluição em cromatografia de exclusão molecular, fração coletada em 16 mL; 10) fração coletada em 21 mL; 11) fração coletada em 26 mL.....	56
Figura 19 - Espectro de emissão fluorescente da SEPT12G. Obtido após a incidência de luz no comprimento de onda igual a 280 nm.....	58
Figura 20 - Perfil cromatográfico dos nucleotídeos de guanina em coluna de troca iônica DEAE-5PW. A) avaliação do conteúdo de nucleotídeo; B) análise da atividade GTPásica.....	59
Figura 21 - Curva de calibração de GDP para avaliação da porcentagem de saturação da SEPT12G.	60
Figura 22 - Termogramas obtidos para a SEPT12G. Amostras da proteína SEPT12G nas concentrações de 18,6 μ M (A) e 29,7 μ M (B).....	61
Figura 23 - Cristais da SEPT12G. Exemplos de cristais obtidos para a condição G2 do kit de cristalização <i>Morpheus</i>	62
Figura 24 - Conteúdo da unidade assimétrica das estruturas cristalográficas obtidas para a SEPT12G. Nas figuras estão ilustradas as unidades assimétricas de cada estrutura cristalográfica. A) SEPT12G-GMPPNP1; B) SEPT12G-GMPPNP2; C) SEPT12G-GDP e D) Topologia observada na estrutura SEPT12G-GMPPNP2. As cadeias estão representadas por cores: cadeia A em azul, cadeia B em vermelho, cadeia C em amarelo e cadeia D em verde.....	65

Figura 25 - Sobreposição das estruturas de SmSEPT10G ligadas a GTP e GDP. O deslocamento da fita parece ser um mecanismo de comunicação entre as interfaces G e NC. A estrutura da SmSEPT10 ligada a GTP é mostrada na cor azul escuro, enquanto a estrutura SmSEPT10 ligada a GDP em azul claro. A fita na qual foi observado o deslocamento está destacada em amarelo (complexo com GTP) e em laranja (complexo com GDP). 68

Figura 26 - Alinhamentos das estruturas primárias das septinas que compõem o subgrupo I (SEPT3, SEPT9 e SEPT12). Todos os resíduos discutidos neste trabalho estão representados no alinhamento. Os resíduos destacados em verde referem-se àqueles específicos para o subgrupo I de septinas humanas, em ciano os resíduos que são iguais em todas as septinas humanas, em amarelo os que variam e em rosa os resíduos específicos para a SEPT12. As regiões características estão destacadas pelos quadrados e a numeração foi baseada na SEPT12. 69

Figura 27 - Sobreposição dos quarto monômeros obtidos na unidade assimétrica das estruturas SEPT12G-GDP (A) e SEPT12G-GMPPNP2 (B)...... 70

Figura 28 - Motivos característicos das pequenas GTPases, incluindo septinas. O P-loop está representado em vermelho, o switch I em azul, o motivo G3 ou switch II em violeta e, por fim, o motivo G4 em ciano. Em destaque alguns dos aminoácidos importantes para a ligação e hidrólise do nucleotídeo..... 71

Figura 29 - Interações estabelecidas pelos resíduos de aminoácidos que compõem o motivo G4. A) proteína SEPT12; B) proteína SEPT9. O resíduo da região G4 está destacado na forma de stick em vermelho, sendo que este resíduo é uma Arg195 para a SEPT12 e Lys170 para a SEPT9. A segunda arginina envolvida na interação de empilhamento está representada na forma de stick em azul (Arg266 na SEPT12 e Arg241 na SEPT9). Os resíduos que interagem com os resíduos Arg e Lys estão destacado em sticks na cor amarela, sendo uma Ser198 e Gly59 para a SEPT12 e uma Ala142 e Gly33 para a SEPT9. 72

Figura 30 - Esquema de polimerização de um filamento de septinas baseados em octâmeros. Cada posição é ocupada por um representante de cada grupo de septina (mostrado em cores). Destacando a alternância entre as interfaces G e NC. 73

Figura 31 – Resíduos que estabelecem importantes interações para a manutenção da interface G no homodímero da SEPT12G. (A) Estrutura cristalográfica da interface G do homodímero; Destaque para os resíduos importantes no homodímero da SEPT12G (B) e da SEPT9G (C). A cadeia D está destacada em verde escuro e a cadeia A em verde claro. Os resíduos

destacados na forma de sticks são a Arg195 da SEPT12 e a Lys170 da SEPT9 em vermelho e os resíduos que interagem com eles: Pro167, Gly59 e Ser198 na SEPT12 e Th173 e Gly33 na SEPT9.

..... 74

Figura 32 - Localização da serina fosforilada na interface G do homodímero da SEPT12G.

A estrutura cristalográfica da SEPT12G-GMPPNP2 está representada em ribbons, enquanto que o resíduo Ser198 e o nucleotídeos foram destacados na forma de sticks. Para representar o volume que a Ser198 fosforilada ocuparia nesta posição, esta foi representada também na forma de esferas transparentes. 75

Figura 33 - Interações responsáveis pela estabilização do nucleotídeo de guanina e do íon Mg^{2+} .

A) Resíduos que interagem com o nucleotídeo **B)** Resíduos que coordenam o íon Mg^{2+} . As imagens foram obtidas com base na estrutura SEPT12G-GMPPNP2. As distância entre os resíduos estão representadas..... 76

Figura 34 - Interfaces NC observadas para a estrutura cristalográfica da SEPT12G-GMPPNP2.

A) Interface fechada e assimétrica na estrutura SEPT12G-GMPPNP; **B)** interface fechada na estrutura SEPT9-GTP γ S e **C)** interface aberta na estrutura SEPT12G-GMPPNP. As interfaces estão representadas na forma de cartoons, sendo que a estrutura de baixo encontra-se rotacionada por 90° em relação ao de cima. Em A estão indicadas as posições das hélices $\alpha 2$ e $\alpha 6$.

..... 78

Figura 35 - Filamentos observados em septinas do subgrupo I.

A) Estrutura da SEPT12G-GMPPNP, que apresenta interfaces NC nas conformações aberta e fechada dentro do mesmo filamento; **B)** Estrutura da SEPT9-GTP γ S, que apresenta todas as interfaces NC na conformação fechada. 79

Figura 36 - Interações observadas na interface NC.

A) Pontes salinas formadas pelos resíduos que auxiliam na estabilização da interface aberta; **B)** Pontes salinas que estabilizam a interface fechada. Os resíduos de aminoácidos em destaques estão representados em sticks na coloração vermelha para os resíduos ácidos e em azul para os resíduos básicos..... 80

Figura 37 - Resíduos de aminoácidos envolvidas nas interações que estabilizam a interface NC fechada da SEPT12G.

Os resíduos destacados na forma de sticks estão representam os resíduos ácidos em vermelho, resíduos básicos em azul e resíduos neutros em amarelo. Os elementos de estrutura secundária envolvidos na formação das interfaces (hélices $\alpha 2$ e $\alpha 6$ das subunidades “baixa” e “alta”) também estão destacados..... 81

Figura 38 - Esquema representativo das interações que favorecem a orientação diferencial da hélice $\alpha 5'$. Nas septinas do subgrupo I pode-se observar que após o resíduo Pro224, o caminho da cadeia polipeptídica se altera e, assim a hélice $\alpha 5'$ forma-se em uma orientação diferente da observada para as septinas de outros subgrupos, representada pela linha pontilhada. Nesta orientação, os resíduos Phe228 e Ile305 podem interagir e o resíduo Asp234 está disponível para estabelecer interações com a Arg149.....	83
Figura 39 - Representação dos elementos de estrutura secundária afetados pela ausência de 41 resíduos de aminoácidos na região central da variante 1. A) Alinhamento das estruturas primárias das variantes 1 e 2 com auxílio da ferramenta de bioinformática Clustal. Destacando-se as regiões que codificam os elementos de estrutura secundária hélice $\alpha 2$ e folha $\beta 4$. B) Estrutura cristalográfica da SEPT12G-GMPPNP2 com destaque em azul para as regiões que não existiriam na variante 1.....	84
Figura 40 - Distribuição dos resíduos característicos da SEPT12 na estrutura cristalográfica SEPT12G-GMPPNP2.	86
Figura 41 - Alinhamento das estruturas cristalográficas das proteínas SEPT2-GTP, SEPT3-GMPPNP, SEPT9-GTPγS e SEPT12-GMPPNP. As estruturas cristalográficas estão representadas nas colorações: verde claro para a SEPT3-GMPPNP (código PDB: 4Z51), verde escuro para a SEPT9-GTP γ S (código PDB: 5CYP), ciano para a SEPT12-GMPPNP e amarelo para a SEPT2-GDP (código PDB: 2QNR).	87
Figura 42 - Mudança no caminho da cadeia principal a partir do resíduo de Pro224. A) Localização dos resíduos Pro224 em SEPT12 e His212 em SEPT2; B) Localização dos resíduos Ile305 e Pro228 que passam a interagir após a re-orientação da hélice $\alpha 5'$. Em ciano está representada a estrutura das proteínas da SEPT12, representando o subgrupo I, e em amarelo a estrutura da SEPT2.	88
Figura 43 - Padrão de expressão e purificação da SEPT12G^{T89M}. No gel de agarose estão representadas as amostras: M) marcador de baixo peso molecular; 1) proteínas totais de E. coli antes da indução; 2) fração solúvel após lise; 3) fração insolúvel após lise; 4) não ligado; 5) lavagem 1; 6) lavagem 2 e 7-8) alíquotas da eluição.....	89
Figura 44 - Conteúdo da unidade assimétrica da estrutura cristalográfica SEPT12G^{T89M}-GDP.	90

Figura 45 - Sítio de ligação ao nucleotídeo da SEPT12G^{T89M}-GDP. O íon Mg ²⁺ em verde é coordenado pelos resíduos Met89, Asp112 (por meio de uma água), Ser63 e fosfato β.....	93
Figura 46 - Interface NC da estrutura cristalográfica da SEPT12G^{T89M}-GDP. As interfaces estão representadas na forma de cartoons, sendo que a estrutura de baixo encontra-se rotacionada por 90° em relação ao de cima.	93
Figura 47 - Análise de restrição. Subclonagem da SEPT12G no plasmídeo pETDuet-1 SEPT7NGc. No gel está representado: M) marcador 1 kb DNA Ladder (Promega), 1) produtos da digestão.	95
Figura 48 - Análise da purificação do complexo formado pelas proteínas SEPT7NGc e SEPT12G em SDS-PAGE 12 %. A) Purificação utilizando o tampão contendo 500 mM de NaCl; B) Tampão contendo 300 mM de NaCl. Nos géis estão representados: M) o marcador de baixo peso molecular; 1) alíquota antes da indução; 2) alíquota após a indução; 3) sobrenadante após lise; 4) pellet; 5) fração não ligada; 6) lavagem 1; 7) lavagem 2; 8) eluição.....	96
Figura 49 - Purificação do complexo em cromatografia de exclusão molecular. A) Perfil cromatográfico; B) Curva de calibração em coluna Superdex200; C) SDS-PAGE 12 % correspondente aos picos eluídos em A: M) marcador de massa molecular; 1) pico 1; 2) pico 2; 3) pico 3 e 4) pico 4.....	97
Figura 50 - Dispersividade das amostras do heterodímero SEPT7NGc-SEPT12G analisadas pelo método de SEC-MALS. A curva em azul corresponde à leitura do espalhamento de luz a 90° (LS), em vermelho refere-se ao sinal do índice de refração diferencial (dRI) e o sinal em preto refere-se à distribuição de massa molecular para os picos obtidos. Em destaque encontra-se o gráfico do sinal obtido para o dRI versus o tempo, ampliado para melhor visualização.	98
Figura 51 - Conteúdo de nucleotídeo para o heterodímero SEPT7NGc-SEPT12G.	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição de septinas em organismos modelos.	23
Tabela 2 - Primers utilizados na amplificação dos DNAs que codificam as variantes da SEPT12G humana. Os sítios de restrição encontram-se destacados em vermelho.	36
Tabela 3 - Ciclos de temperatura da reação de PCR.	37
Tabela 4 - Step gradiente de NaCl utilizado na cromatografia de troca aniônica. Para a análise do teor de nucleotídeos e ensaio da atividade GTPásica.	44
Tabela 5 - Primers utilizados na produção dos mutantes de SEPT12 pelo método da mutagênese sítio dirigida.	48
Tabela 6 - Ciclos de aquecimento da reação de mutagênese sítio-dirigida.	48
Tabela 7 - Valores obtidos para a análise da porcentagem de saturação da SEPT12G.	60
Tabela 8 - Condições de cristalização do kit Morpheus em que foram obtidos cristais da SEPT12G.	63
Tabela 9 - Dados do processamento e refinamento das estruturas da SEPT12G ligada a ambos os nucleotídeos. Em parênteses estão representados os valores para a camada de mais alta resolução, cuja faixa de resolução é 2,12-2,18 Å para a SEPT12G-GMPPNP1, 1,86-1,91 Å para a SEPT12G-GMPPNP2 e 2,19-2,25 Å para a SEPT12G-GDP.	66
Tabela 10 - Resíduos característicos das proteínas do grupo I. Os resíduos destacados com asteriscos encontram-se representados na Figura 26.	85
Tabela 11 - Condição de cristalização do kit Morpheus em que foram obtidos cristais da SEPT12G^{T89M}.	90
Tabela 12 - Dados do processamento e refinamento das estruturas da SEPT12G^{T89M} ligada a GDP. Em parênteses estão representados os valores para a camada de mais alta resolução, cuja faixa de resolução é 2,17-2,23 Å para a SEPT12G^{T89M}-GDP.	91
Tabela 13 - Parâmetros obtidos para a análise de SEC-MALS do heterodímero SEPT7NGc-SEPT12G.	99
Tabela 14 - Parâmetros de cela unitária para a estrutura da SEPT7 disponível na literatura e para o conjunto de dados obtidos para a espécie SEPT7NGc-SEPT12.	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ala – Alanina

Arg – Arginina

Asn - Asparagina

Asp – Ácido Aspártico

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

C. elegans – *Caenorhabditis elegans*

CDC – *Cell division cycle*

cGMP – guanosina-5-monofosfato cíclica

CNS – *Central nervous system*

C_p – capacidade calorífica a pressão constante

D. melanogaster – *Drosophila melanogaster*

ddNTPs – Didesoxirribonucleotídeos Fosfatados

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DO – Demanda de oxigênio

DSC – *Differential Scanning Calorimetry*

GDP – Guanosina-5-trifosfato

Gln – Glutamina

Glu – Ácido glutâmico

Gly – Glicina

GMPPNP – Guanilil-5-imidodifosfato

GSK3 – Glicogênio sintase quinase 3

GTP – Guanosina-5-difosfato

H. sapiens – *Homo sapiens*

His – Histidina

HPLC – *High performance liquid chromatography*

Ile – Isoleucina

IPTG – Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo

kDa – quilo Dalton

LB – Luria Bertani

Lys – Lisina

M. musculus – *Mus musculus*

MALS – *Multi-Angle Light Scattering analysis*)

Met – Metionina

nm – Nanômetros

pb – Pares de bases

PCR – *Polymerase chain reaction*

PDB – *Protein Data Bank*

PEG – Polietilenoglicol

Phe - Fenilalanina

PKA – Proteína quinase A

Pro – Prolina

R. norvegicus – *Rattus norvegicus*

RMS – *Root Mean Square*

S. cerevisiae – *Saccharomyces cerevisiae*

SDS-PAGE – *Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel eletrophoresis*

SEC – *Size exclusion chromatography*

SEPT_ – Septina

Ser – Serina

SmSEPT10 – Septina 10 da *Schistosoma mansoni*

SUE – *Septin unique elemento*

TCEP – Tris(2-carboxyethyl)phosphine

Thr – Treonina

T_m – Temperatura de desnaturação térmica (do inglês, *melting temperature*)

Tyr – Tirosina

Val – Valina

X-Gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β-D-galactopiranosídeo

ΔH – Entalpia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 A família das septinas	22
1.2 Septinas humanas.....	26
1.3 Formação dos complexos de septinas humanas.....	28
1.4 Septinas na espermatogênese.....	30
2 JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVO	34
3.1 Objetivos específicos	34
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	35
4.1 Domínio de ligação ao nucleotídeo da SEPT12 humana.....	35
4.1.1 Clonagem	35
4.1.2 Expressão	39
4.1.3 Purificação	40
4.1.3.1 Purificação por cromatografia de afinidade.....	40
4.1.3.2 Purificação por cromatografia de exclusão molecular.....	41
4.1.3.3 Avaliação do estado oligomérico da SEPT12G humana	41
4.1.4 Espectroscopia de Fluorescência	42
4.1.5 Análise do conteúdo de nucleotídeo e ensaio da atividade GTPásica da SEPT12G humana	43
4.1.5.1 Curva de calibração GDP.....	44
4.1.6 Calorimetria de varredura diferencial (DSC).....	44
4.1.7 Ensaio de cristalização	45
4.1.8 Resolução das estruturas	46

4.2 Domínio de ligação ao nucleotídeo dos mutantes SEPT12G ^{T89M} e SEPT12G ^{D197N}	47
4.2.1 Obtenção dos mutantes da SEPT12G	47
4.2.2 Expressão e purificação dos mutantes da SEPT12G	48
4.2.3 Ensaios de cristalização	49
4.3 Heterodímero SEPT7-SEPT12	49
4.3.1 Clonagem e expressão.....	49
4.3.2 Purificação	49
4.3.3 Análise do estado oligomérico por cromatografia de exclusão molecular acoplada a análise da dispersão de luz em vários ângulos (SEC-MALS)	50
4.3.4 Análise do conteúdo de nucleotídeo	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Domínio de ligação ao nucleotídeo da SEPT12 humana.....	52
5.1.1 Clonagem e expressão.....	52
5.1.2 Purificação da SEPT12G humana variante 2.....	54
5.1.3 Avaliação do estado oligomérico da SEPT12G humana	55
5.1.4 Espectroscopia de Fluorescência	57
5.1.5 Análise do conteúdo de nucleotídeo e ensaio da atividade GTPásica da SEPT12G humana	58
5.1.5.1 Curva de calibração GDP.....	59
5.1.6 Calorimetria de varredura diferencial (DSC).....	60
5.1.7 Estrutura Cristalográfica da SEPT12G	62
5.1.7.1 Estudos da interface G	72
5.1.7.2 Estudos da interface NC.....	77
5.1.6.2 Variante 1 da SEPT12G humana	83
5.1.6.3 Resíduos característicos do subgrupo I das septinas humanas	84
5.2 Domínio de ligação ao nucleotídeo do mutante de SEPT12G.....	89

5.2.1 Obtenção do mutante SEPT12G ^{T89M}	89
5.2.2 Estrutura Cristalográfica SEPT12G ^{T89M}	90
5.3 Heterodímero SEPT7NGc-SEPT12G	94
5.3.1 Clonagem, coexpressão e purificação do heterodímero	94
5.3.2 Análise do estado oligomérico por cromatografia de exclusão molecular acoplada a análise da dispersão de luz em vários ângulos (SEC-MALS)	98
5.4 Análise do conteúdo de nucleotídeo para o heterodímero SEPT7NGc-SEPT12	99
6 CONCLUSÃO	102
7 PERSPECTIVAS	104
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

1 INTRODUÇÃO

1.1 A família das septinas

Em 1971 Lee Hartwell realizou uma varredura dos genes envolvidos no processo de divisão celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, com o objetivo de encontrar proteínas cruciais para o processo [1,2]. Os estudos resultaram na descoberta de quatro genes mutantes sensíveis à temperatura expressos durante o brotamento, denominados de *cdc3*, *cdc10*, *cdc11* e *cdc12* (CDC, do inglês *cell division cycle*) [1,2]. Em determinadas temperaturas, as cepas mutantes desenvolviam múltiplos brotos com pescoços alongados que não eram capazes de se separar das células mães, formando células multinucleadas, ilustradas na Figura 1A [2].

Figura 1 - Heterofilamentos identificados durante o brotamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A) Micrografia ótica da levedura termosensível contendo a mutação no gene *cdc3*. Pode-se observar que na temperatura restritiva, que nesse experimento foi de 36 °C, as células filhas não se separam das células mães, formando células multinucleadas; B) Micrografia eletrônica de transmissão de uma célula em brotamento. Em destaque os filamentos observados; C) Micrografia de fluorescência destacando a localização das septinas durante a divisão celular. Inicialmente elas se organizam em um anel planar, conforme o processo de brotamento se inicia, os filamentos de septinas se estendem e passam a ter uma forma de ampulheta. Por fim, o filamento de septinas se divide e as células ficam com um anel planar de septinas.

Fonte: 1a) Adaptada de HARTWELL, L. H., 1971; 1b e 1c) GLADFELTER, A. S.; PRINGLE, J. R.; LEW, D. J., 2001.

O processo de brotamento da levedura continuou sendo estudado e, em 1976, Byers e Goetsh observaram por microscopia eletrônica de transmissão a presença de filamentos com aproximadamente 10 nm de espessura delimitando o pescoço que separa as células mães das células-filhas, Figura 1B [1,3]. Posteriormente, foi demonstrado por microscopia de fluorescência que os filamentos eram compostos do produto das proteínas cdc3, cdc10, cdc11 e cdc12, disposto em forma de anel, conforme ilustrado na Figura 1C [4]. Assim, a família das proteínas que atuam no processo de citocinese e formação do septo em leveduras foi denominada de septinas [1,4].

Proteínas pertencentes a essa família foram encontradas em diversos eucariotos, com exceção de plantas, como a *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *D. melanogaster* e *H. sapiens*. Na Tabela 1 estão descritas as septinas identificadas em organismos modelo. Os mamíferos incluem os organismos *H. sapiens*, *M. musculus*, *R. norvegicus* e as seguintes observações devem ser levantadas: a SEPT13 é considerada um pseudogene da SEPT7; nos organismos *M. musculus* e no *R. norvegicus* a SEPT10 é duplicada (SEPT10a e SEPT10b) e a SEPT14 não foi identificada em *R. norvegicus* [5-7].

Tabela 1 - Distribuição de septinas em organismos modelos.

Organismo	Septina
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cdc10, Cdc3, Cdc11, Cdc12, Shs1, Spr3, Spr28
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Spn2, Spn1, Spn3, Spn4, Spn5, Spn6, Spn7
<i>Candida albicans</i>	Cdc10, Cdc3, Cdc11, Cdc12, Sep7, Spr3, Spr28
<i>Eremothecium gossypii</i>	Hyp3, Hyp1, Hyp4, Hyp2, Hyp6, Hyp5, Hyp7
<i>Aspergillus nidulans</i>	AspD, AspB, AspA, AspC, AspE
<i>Neurospora crassa</i>	Hyp3, Hyp1, hyp4, Hyp2, Hyp5, Hyp6
<i>Caenorhabditis elegans</i>	UNC-61, UNC-59
<i>Drosophila melanogaster</i>	SEP2, SEP5, Pnut, SEP1, SEP4
<i>Xenopus laevis</i>	HYP1, SEPT2
Mammals	SEPT3, SEPT9, SEPT12, SEPT6, SEPT8, SEPT10, SEPT11, SEPT14, SEPT1, SEPT2, SEPT4, SEPT5, SEPT7, SEPT13

Fonte: Adaptado de WEIRICH, C. S.; ERZBERGER, J. P.; BARRAL, Y., 2008 e KINOSHITA, M., 2003.

As septinas são caracterizadas por ligar-se a nucleotídeos de guanina e interagir entre si de forma específica para formar heterofilamentos não polares, cuja associação resulta em estruturas de ordem superior, tais como feixes, redes, anéis e espirais [1]. Essas estruturas foram associadas ao desempenho da função biológica das septinas desde o seu descobrimento, quando o heterofilamento encontrado em *S. cerevisiae* foi descrito como uma barreira capaz de recrutar diversas proteínas para o sítio de divisão, onde elas podem desempenhar as suas funções [1,4].

Estudos funcionais têm reportado uma grande diversidade de processos celulares, incluindo citocinese [8,9], neurogênese [10], interação com a membrana plasmática [11], controle do ciclo celular [12,13], posicionamento do fuso na divisão celular [14,15], morfologia celular, deposição de quitina e função da actina e microtúbulos [1], tráfico de vesículas [16], exocitose e apoptose. Além disso, elas possuem funções importantes na liberação de neurotransmissores, atividade e conectividade do sistema nervoso [1]. A compartimentalização dependente de septinas foi inicialmente descrita em leveduras, no entanto septinas de mamíferos também têm demonstrado capacidade de formar barreiras de difusão. Em células que não sofrem o processo de divisão celular, como neurônios [17,18] e espermatozoides [19-21], septinas contribuem para a formação de barreiras de difusão que compartimentam proteínas de membrana em domínios celulares específicos [22,23], alguns processos estão ilustrados na Figura 2.

Figura 2 - Representação das estruturas compostas por septinas em diferentes processos biológicos.

Exemplo da localização dos filamentos de septinas nos processos de citocinese, estruturas para ancoramento de proteínas na membrana plasmática, organização do *annulus* em espermatozoides e formação de barreira de difusão.

Fonte: Adaptado de MOSTOWY, S.; COSSART, P., 2012.

Nos humanos existem treze representantes da família, cuja expressão pode ser ubíqua ou tecido específica. As proteínas SEPT2, SEPT5, SEPT6, SEPT7, SEPT9, SEPT10 e SEPT11 são expressas de forma ubíqua, enquanto as demais são tecido-específicas. A SEPT1 é expressa nos linfócitos e células do sistema nervoso central (CNS, do inglês *central nervous system*); a SEPT3 em neurônios; a SEPT4 nos linfócitos, células do CNS, olhos e testículos; a SEPT8 nos linfócitos, células do CNS, olhos, intestinos e placenta; a SEPT12 nos testículos e a SEPT14 em células do CNS e testículos. A distribuição das septinas no corpo humano está ilustrada na Figura 3 [24-26].

Figura 3 - Distribuição das septinas no corpo humano. Em destaque os processos biológicos nos quais as septinas estão envolvidas para cada sistema do corpo humano.

Fonte: Adaptado de DOLAT, L.; HU, Q.; SPILIOTIS, E. T., 2014.

Devido à diversidade dos processos celulares em que as septinas apresentam funções, alterações relacionadas à sua expressão e mutações fazem com que estas estejam associadas com patologias em humanos, como cânceres (cólon, leucemia, linfoma e outros), síndrome de Down, desordem bipolar, esquizofrenia, leucemia, linfoma e infertilidade [24-26].

Algumas septinas também são associadas às doenças neurológicas Alzheimer e mal de Parkinson. A proteína SEPT5 tem sido reportada como uma proteína cuja ligação a Parkin, uma E3 ubiquitina-ligase, promove sua degradação [1]. Entretanto, falhas nesse processo podem resultar na acumulação da SEPT5 no cérebro em mal de Parkinson [27]. As septinas, SEPT1, SEPT2 e SEPT4, foram observadas em acúmulos dentro de estruturas citoplasmáticas patológicas como neurofibrilas na doença de Alzheimer e corpos de inclusão em mal de Parkinson [27,28].

1.2 Septinas humanas

As treze septinas humanas são proteínas de ligação ao GTP de pequena massa molecular (30 a 65 kDa) que, em função da similaridade de suas sequências, são divididas em quatro grupos: grupo I (SEPT3, SEPT9 e SEPT12), grupo II (SEPT6, SEPT8, SEPT10, SEPT11 e SEPT14), grupo III (SEPT1, SEPT2, SEPT4 e SEPT5) e grupo IV (SEPT7), Figura 4 [1,29-33]. No entanto, muitas isoformas são codificadas a partir desses genes, devido ao processo de *splicing* alternativo e modificações pós-traducionais, que estão relacionados à expressão tecido-específica [1,33]. Enquanto a maioria das septinas tem a capacidade de hidrolisar GTP, os membros do grupo II são cataliticamente inativos e estão sempre ligados a GTP [1,33].

Figura 4 - Caracterização e classificação das septinas de mamíferos. A) Diagrama esquemático dos domínios presentes nas septinas. Em cinza o domínio N-terminal, cuja composição de aminoácidos é bastante variável; em amarelo a região polibásica; em verde o domínio central GTPase com os três motivos de interação com o nucleotídeos (G1, G2 e G3); em azul a região denominada SUE (*septin unique element*) e, por fim, em laranja o C-terminal, muitas vezes formando um domínio *coiled-coil*, mas com sequência e comprimento bastante variáveis ao longo dos grupos; B) Diagramas esquemáticos dos domínios presentes nas septinas, de acordo com a classificação em grupos.

Fonte: Adaptado de NEUBAUER, K.; ZIEGER, B., 2017.

As septinas são filogeneticamente classificadas na classe das *P-loop* GTPases (*phosphate-binding loop*) que incluem as *Ras-like* GTPases [34]. Elas possuem cinco domínios característicos: i) o domínio N-terminal que é uma região altamente variável, tanto em relação a composição de resíduos de aminoácidos quando em relação ao tamanho; ii) a região polibásica rica em resíduos de prolina e conhecida pela sua capacidade de se ligar diretamente aos fosfoinosítídeos da membrana plasmática [35-36]; iii) o domínio de ligação ao nucleotídeo (domínio G), região mais conservada com um mínimo de 63 % de similaridade entre septinas da mesma espécie. Ele é

composto de hélices α e fitas β alternadas e separadas por *loops* flexíveis e contém os motivos envolvidos na ligação do nucleotídeo G1 (*Walker A motif* GxxxxGK[ST]), G3 (*Walker B motif* DxxG) e G4 (*GTP-specificity motif* NKxD) [34,36]; iv) região SUE (*septin unique element*), uma sequência de 56 resíduos de aminoácidos conservada em diferentes espécies, importante para a associação entre septinas [37] e v) o domínio C-terminal também é uma região de composição e tamanho variável. Todos os grupos de septinas, com exceção do grupo I, podem apresentar um domínio do tipo *coiled-coil* nesta região, que foi associado à interação septina-septina e de septinas com outras proteínas [38].

1.3 Formação dos complexos de septinas humanas

Desde a sua descoberta, as septinas são caracterizadas como proteínas capazes de formar filamentos, sendo desconhecidas funções de septinas individuais nos organismos. O tamanho e a variedade desses complexos dependem da quantidade de genes que codificam septinas presentes nos organismos. Por exemplo, em *C. elegans* existem dois genes para septinas e, assim, são encontrados heterotetrâmeros nos quais há duas cópias de cada septina [39]. Em *S. cerevisiae* estudos utilizando microscopia eletrônica de transmissão identificaram complexos octaméricos compostos por duas cópias de quatro septinas diferentes, sendo a ordem observada a partir do uso de anticorpos de cdc11-cdc12-cdc3-cdc10-cdc10-cdc3-cdc12-cdc11 [40]. Nos humanos, as treze septinas se organizam em complexos hexaméricos ou octaméricos que apresentam variedade de composição, devido à expressão gênica e ao *splicing* alternativo. Por exemplo, em tecidos de testículos podem ser encontrados dois octâmeros: 12-7-6-2-2-6-7-12 ou 12-7-6-4-4-6-7-12 [41,42].

Os complexos de septinas formam filamentos não polares, diferentes daqueles formados por actina ou microtúbulos, cujas extremidades são quimicamente distintas. Esses filamentos são um arranjo linear de monômeros de septinas, como um cordão de contas, em que cada septina ocupa uma posição específica [1,31]. Os filamentos podem se associar lateralmente, formando filamentos empacotados, que podem se tornar estruturas de ordem superior. Estas estruturas filamentosas são consideradas a forma biologicamente ativa das septinas [1,33].

Atualmente, o complexo cristalográfico de septinas humanas melhor caracterizado é hexamérico e composto pelas septinas humanas 2, 6 e 7, ilustrado na Figura 5 [43]. Dois tipos de interfaces se alternam ao longo do filamento, a interface G (onde se encontra o sítio de ligação ao

nucleotídeo) e a interface NC, formada devido à interação entre as regiões amino-terminal e carboxi-terminal do domínio de ligação ao GTP. Este complexo demonstra que as septinas interagem com subunidades vizinhas de forma específica para formar o heterofilamento. A obtenção dessa estrutura também levantou a hipótese de que a posição da SEPT6 ligada a GTP, proteína cataliticamente inativa devido à ausência da treonina na região do *switch* I, na região central do complexo pode auxiliar na estabilização das interfaces formadas com a SEPT2 e SEPT7 [44].

Figura 5 - Estrutura do complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7. Nesta figura estão representadas as interfaces de interação denominadas de NC e G entre as septinas. As subunidades em cinza, nas extremidades da figura, correspondem à possibilidade de extensão do filamento, devido à adição de outros hexâmetros nessa posição. As setas na parte superior da figura indicam as posições e orientações dos domínios *coiled-coil*. Os nucleotídeos associados estão representados (GTP e GDP).

Fonte: Adaptado de WITTINGHOFFER, A.; et. al, 2007.

Com base na organização das septinas no complexo, Kinoshita e colaboradores propuseram que as septinas podem ser substituídas desde que a substituta seja do mesmo grupo (Figura 4) como, por exemplo, a SEPT2 poderia ser substituída pelas septinas pertencentes ao grupo III (SEPT 1, SEPT4 e SEPT5) [45]. No entanto, a observação feita por Kinoshita não permitiu elucidar a posição ocupada pelas septinas do grupo I nos complexos baseados em hexâmeros. Novas abordagens estruturais se tornaram possíveis após a descoberta de que a SEPT9 pode ocupar a posição terminal no complexo SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7, conforme observado na Figura 6. No entanto, ainda não foi reportada nenhuma caracterização estrutural de complexos octaméricos [45].

Figura 6 - Modelo esquemático de complexos de septinas. A) baseados em hexâmetros; **B)** baseados em octâmeros.

Fonte: Elaborada pela autora.

Embora os filamentos de septinas sejam as estruturas de maior importância funcional, pouco se sabe sobre a formação dos complexos, montagem e desmontagem dos filamentos e especificidade da interação septina-septina e septinas-proteínas parceiras [45]. Estudos realizados em levedura demonstraram que modificações pós-traducionais, como a sumoilação, fosforilação e acetilação são capazes de modular a dinâmica da formação dos filamentos de septinas [46]. As septinas da *Saccharomyces cerevisiae* são sumoiladas durante o ciclo celular, no entanto mutações nos sítios de sumoilação interferem na desmontagem do anel de septinas no sítio anterior ao ciclo de divisão [47]. Outros estudos sugerem que a perda da desfosforilação dependente da enzima PP2A da levedura Shs1 resulta em falhas na remoção do anel de septina no broto no final da citocinese [48]. Em humanos muitos estudos identificaram modificações pós-traducionais em septinas, no entanto o seu papel na montagem dos filamentos *in vivo* é desconhecido. Os exemplos reportados na literatura são: fosforilação da SEPT3 pela proteína quinase dependente de cGMP 1 (PKG-I) em terminais nervosos [49,50], fosforilação da SEPT4 pela glicogênio sintase quinase (GSK3) em espermatozoides [51], ubiquitinação da SEPT5 pela proteína de ligação a Parkin E3 que causa a sua degradação [27] e fosforilação da SEPT12 pela proteína quinase A em testículos [46].

1.4 Septinas na espermatogênese

A infertilidade é um problema de saúde global que afeta, aproximadamente, 15 % dos casais. Ela foi associada com defeitos anatômicos, disfunção da gametogênese, endocrinopatias, problemas imunológicos, falhas ejaculatórias, exposições ambientais e mutações genéticas [52].

O papel das septinas na espermatogênese começou a ser questionado a partir da identificação de alguns representantes da família na estrutura do espermatozoide. As proteínas SEPT2, SEPT4, SEPT6, SEPT7 e SEPT12 foram reportadas como componentes do *annulus* do

espermatozoide, uma submembrana com estrutura anelar que delimita a peça intermediária e a cauda do espermatozoide [53-54]. Foram reportados complexos octaméricos formados por septinas com as seguintes distribuições: 12-7-6-2-2-6-7-12 ou 12-7-6-4-4-6-7-12 [41,42,55].

Nesses complexos, os domínios de ligação ao GTP das proteínas SEPT12 e SEPT7 interagem entre si, formando uma interface G e os domínios N e C-terminal da SEPT12 são responsáveis pela polimerização dos octâmeros na produção dos filamentos [42]. A SEPT12 é exclusivamente expressa nos testículos e estudos realizados em homens inférteis, resultaram na identificação de duas mutações: SEPT12^{T89M} e SEPT12^{D197N} [1,42]. Ambas ocorrem no domínio de ligação ao nucleotídeo (domínio G) e perturbam profundamente a formação dos filamentos, como pode ser observado na Figura 7 [41,42]. As figuras mostram a dissociação dos filamentos quando há a presença de um dos mutantes da SEPT12.

Figura 7 - Mutações no domínio G da SEPT12 interrompem a formação dos filamentos. Ensaios de imunofluorescência de células de carcinoma embrionário testicular humano (NT2/D1) transfectadas com os plasmídeos que codificam a fusão das septinas com as proteínas GFP, FLAG e Myc (GFP-SEPT12, FLAG-SEPT7 e Myc-SEPT6) mostram os padrões subcelulares das septinas citadas e da SEPT2 endógena na presença da SEPT12 e dos mutantes SEPT12^{T89M} e SEPT12^{D197N}. A) SEPT12 selvagem; B) SEPT12^{T89M}; C) SEPT12^{D197N}.

Fonte: Adaptada de Kuo et al., 2015.

Em homens inférteis que apresentavam esses genes mutantes, observaram-se espermatozoides com decréscimo de motilidade e concentração, defeitos estruturais e morfológicos, como a observação de cauda curvada [54, 41, 55]. A SEPT12^{D197N} é incapaz de ligar GTP e os pacientes com essa mutação apresentavam, principalmente, oligoastenozoospermia, que é a redução na quantidade de espermatozoide no líquido ejaculado, enquanto a SEPT12^{T89M} não é capaz de hidrolisar o GTP, sendo relacionada ao fenótipo de astenozoospermia, cuja característica

é a diminuição da mobilidade do espermatozoide [41,42]. Outro mecanismo foi recentemente relacionado à infertilidade masculina, Kuo e Wang demonstraram que a fosforilação da SEPT12 no resíduo Ser198 pela proteína quinase A (PKA) inibe a montagem do anel de septinas durante a biogênese do *annulus* levando a diminuição da motilidade do espermatozoide. Assim, os pesquisadores concluíram que a fosforilação do resíduo Ser198 dissocia a SEPT12 dos complexos SEPT7-SEPT6-SEPT2 e SEPT7-SEPT6-SEPT4, mas não interrompe a interação SEPT12-SEPT12 [46], conforme observado na Figura 8.

Figura 8 - Modelos esquemáticos ilustrando o efeito da fosforilação da SEPT12 durante a formação do espermatozoide. A) Para a SEPT12 selvagem os anéis de septinas que compõem o *annulus* são formados no pescoço do espermatozoide e migram pelo axonema até atingir a junção entre a peça intermediária e a cauda do espermatozoide. **B)** Após a fosforilação da SEPT12, ela se dissocia dos heterocomplexos formados pelas proteínas SEPT7-SEPT6-SEPT2 e SEPT7-SEPT6-SEPT4, mas ainda é capaz de formar interações SEPT12-SEPT12, ocasionando deformações na morfologia.

Fonte: Adaptada de Kuo et al., 2017.

2 JUSTIFICATIVA

A família das septinas foi descoberta há, aproximadamente, 40 anos e, embora sejam conhecidas importantes funções desempenhadas por estas em processos celulares e doenças com as quais estão associadas, pouco se evoluiu no sentido de determinar as bases moleculares e fisiológicas de suas funções e os mecanismos e controle da formação de filamentos e estruturas de ordem superior. Desta forma, a ausência de informações estruturais de alta resolução tanto para as septinas e, particularmente, para os complexos formados por elas, são um estímulo para o seu estudo. Estas estruturas poderão auxiliar no entendimento da função das septinas nas diversas patologias com as quais têm sido relacionadas.

O estudo das septinas humanas teve início no Brasil no Instituto de Física de São Carlos (IFSC), nos grupos de Biofísica Molecular e Cristalografia e contribuiu de forma relevante para as informações estruturais das septinas. Recentemente, foram publicadas as estruturas cristalográficas na base de dados RCSB *Protein Data Bank* para os domínios G da SEPT7 humana (código de acesso: 3TW4) [56], da SEPT3 humana (código de acesso: 3SOP) [57], da SEPT10 de *Schistosoma mansoni* em complexo com GDP (código de acesso: 4KV9) e GTP (código de acesso: 4KVA) [58], da SEPT9 humana (código de acesso: 5CYP e 5CYO) e SEPT3 (código de acesso: 4Z51 e 4Z54).

Dentro desse contexto, o trabalho teve como principal objetivo a obtenção de resultados biofísicos e estruturais da interface G do heterodímero SEPT7G-SEPT12G, bem como análises estruturais da proteína SEPT12G e mutantes (SEPT12^{T89M} e SEPT12^{D197N}). Essa interface é importante para o desenvolvimento do trabalho com septinas, uma vez que a única estrutura de complexo resolvida não revelou detalhes como *loops* e cadeias laterais, devido à baixa resolução (4 Å).

A SEPT12 também se constitui em uma proteína chave para o grupo de pesquisa, uma vez que foram resolvidas as estruturas para duas representantes do grupo I, SEPT3 e SEPT9. Assim, esta proteína irá complementar as informações observadas, revelando se os aspectos estruturais são conservados ou não no grupo I e pela primeira vez teremos acesso a informações estruturais detalhadas sobre todos os integrantes de um único grupo de septinas, permitindo identificar aspectos comuns e distintos entre seus membros.

3 OBJETIVO

O objetivo central deste trabalho foi o de estudar em termos biofísicos e estruturais o domínio de ligação ao nucleotídeo da proteína SEPT12, a interação entre os domínios G das proteínas que compõem o heterodímero SEPT7-SEPT12 e a produção dos mutantes (SEPT12^{T89M} e SEPT12^{D197N}). Especificamente, procurou-se obter as melhores condições para a cristalização destas proteínas, a fim de contribuir para a compreensão de fatores importantes para a formação do heterodímero, detalhes estruturais da interface NC e avaliar comparativamente os mutantes da SEPT12 e sua relação com os fenótipos encontrados em homens inférteis. Essas informações foram importantes para complementar os estudos com os membros do subgrupo I (SEPT3 e SEPT9).

3.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos presentes neste trabalho são:

- a) Produção recombinante dos domínios G das proteínas SEPT7, SEPT12 e mutantes (SEPT12^{T89M} e SEPT12^{D197N});
- b) Coexpressão do heterodímero SEPT7-SEPT12;
- c) Purificação do heterodímero e validação das interações *in vitro*;
- d) Caracterização biofísica da SEPT12G: avaliação do estado oligomérico, teor de nucleotídeo e atividade GTPásica, espectrometria de fluorescência e calorimetria de varredura diferencial (DSC);
- e) Avaliação do estado oligomérico do heterodímero por cromatografia de exclusão molecular acoplada a análise do espalhamento de luz em múltiplos ângulos (SEC-MALS);
- f) Ensaios de cristalização da proteína SEPT12G, dos mutantes e do heterodímero;
- g) Difração de raios-X dos cristais e coleta de dados para a resolução e interpretação das estruturas cristalográficas.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Esta seção foi dividida de acordo com a proteína utilizada nos procedimentos descritos a seguir.

4.1 Domínio de ligação ao nucleotídeo da SEPT12 humana

4.1.1 Clonagem

A sequência de nucleotídeos que codifica o domínio de ligação ao nucleotídeo da SEPT12 foi identificada em uma pesquisa realizada no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.gov/genbank/>) do portal NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Duas variantes foram encontradas e chamadas de variante 1 (código de acesso: DQ_456996.1) e variante 2 (código de acesso: EF_620906.1). A ferramenta de bioinformática Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) foi utilizada para fazer um alinhamento das sequências com o objetivo de observar as diferenças existentes entre elas. A sequência de nucleotídeos da variante 2 foi utilizada como base para a produção de um gene sintético na empresa *FastBio*.

As regiões codificantes para o domínio de ligação ao nucleotídeo (domínio G) das duas variantes foram amplificadas por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando como molde o gene sintético da SEPT12. Nesta reação, as fitas do DNA são separadas por aquecimento na etapa de desnaturação e, em seguida, ao atingir a temperatura de anelamento, calculada com base nos pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), estes se anelam às fitas simples do DNA. Uma nova etapa de aquecimento, chamada de extensão, promove a amplificação da sequência alvo devido à adição de dNTPs a partir da extremidade 3' do *primer*. As duas fitas complementares são produzidas na direção 5' para 3'. A repetição deste ciclo ocorre várias vezes multiplicando a quantidade de DNA obtida em cada ciclo [59].

As sequências de nucleotídeos dos *primers*, representadas na Tabela 2, foram escolhidas de forma a flanquear a região de interesse e introduzir sítios de restrição que serão necessários nas próximas etapas de clonagens.

Tabela 2 - Primers utilizados na amplificação dos DNAs que codificam as variantes da SEPT12G humana. Os sítios de restrição encontram-se destacados em vermelho.

Nome	Enzima de restrição	Sequência
SEPT12G-Fw- <i>Nde</i> I	<i>Nde</i> I	5'agcatatgggggttgagttcaacatc3'
SEPT12-Rv	<i>Xho</i> I	5'acctcgagttacaggtggctttcattgagtc3'
V1 Reverse	----	5'gtccagggggccgcaggcagttgtcattgtgatctgc3'
V1 Forward	----	5'ctgcggcccctggaacattgagttcctgcagcggctgtgc3'

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a amplificação da variante 1, cujo tamanho é de 684 pb, duas etapas de amplificação foram necessárias, conforme ilustrado na Figura 9. Primeiramente, foram feitas duas reações em paralelo, utilizando-se os pares de *primers* SEPT12G-Fw-*Nde*I/V1 Reverse (Reação 1) e SEPT12G-Rv/V1 Forward (Reação 2). Em seguida, utilizou-se o par de *primers* SEPT12G-Fw-*Nde*I/SEPT12G-Rv (Reação 3) para uma terceira reação na qual os produtos obtidos anteriormente foram empregados como moldes. A amplificação da variante 2 (822 pb) foi realizada em uma única etapa, utilizando-se o par de *primers* SEPT12G-Fw-*Nde*I/SEPT12G-Rv (Reação 4).

Figura 9 - Fragmentos amplificados durante a PCR. Em cinza estão representados as regiões amplificadas e em preto as regiões deletadas. A) Reação 1; B) Reação 2 e C) Reação 3.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nestas reações foram utilizados 25 ng do DNA molde, 1 μ M de cada *primer*, 0,2 mM de dNTP, 2,5 unidades de *High Fidelity PCR Enzyme Mix* (Thermo Scientific), 5 μ L de 10X *High Fidelity PCR Buffer* com 15 mM de $MgCl_2$ (Thermo Scientific) e água Milli-Q para um volume final de 50 μ L. Os ciclos de aquecimento, descritos na Tabela 3, foram realizados segundo o protocolo da enzima *High Fidelity PCR Enzyme Mix* em um termociclador (*Applied Biosystems*). As temperaturas de anelamento utilizadas foram 50, 57, 54 e 51 °C para as reações de 1 a 4, respectivamente. A amplificação dos fragmentos de interesse foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,8 %. Em seguida, os fragmentos obtidos foram purificados utilizando-se o kit *Wizard SV gel and PCR clean up system* (Promega), seguindo as orientações do fabricante.

Tabela 3 - Ciclos de temperatura da reação de PCR.

Etapas	Temperatura (°C)	Duração (min:seg)	Número de ciclos
Desnaturação inicial	94	3:00	1
Desnaturação	94	0:30	
Anelamento	Temperatura de anelamento	0:30	25
Extensão	72	1:00	
Extensão Final	72	10:00	1
	4	Infinito	

Fonte: Elaborada pela autora.

Os fragmentos foram inseridos no plasmídeo de propagação pGEM T-Easy (Promega). Este vetor de propagação é apropriado para a subclonagem dos fragmentos obtidos com o auxílio da enzima *High Fidelity*, uma vez que esta enzima adiciona uma única desoxiadenosina às extremidades 3' dos fragmentos amplificados, independente do molde, que é complementar à desoxitimidina na extremidade 3' do vetor linearizado. A reação de ligação continha 34 ng do produto de PCR amplificado para a variante 1 e 41 ng para a variante 2, 1 μ L de 10X *Buffer* T4 DNA *ligase* (Thermo Scientific), 1 μ L do vetor pGEM T-Easy linearizado e 5 unidades da enzima T4 DNA *ligase* (Thermo Scientific). A reação foi incubada por 16 h a 16 °C.

Após a ligação, o produto foi transformado por choque térmico, em células de *Escherichia coli* da linhagem DH5 α quimicamente competente (produzidas por meio do tratamento com Cloreto de Cálcio) [60]. As células foram espalhadas em uma placa de Petri contendo meio LB sólido com 100 μ g/mL de ampicilina, 0,5 mM de IPTG (isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo) e 80

$\mu\text{g/mL}$ de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo). Em seguida, foram colocadas em uma estufa aquecida a 37 °C por 16 h [60].

As colônias brancas (clones positivos) foram repicadas em um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio LB líquido e 50 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina. Após o crescimento, por 12 h a 37 °C sob agitação de 250 rpm, o DNA plasmidial destas células foi extraído utilizando-se o kit *Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification Systems* (Promega) de acordo com as orientações do fabricante.

Os clones foram analisados por meio de um teste de restrição se baseia na digestão destes com as enzimas de restrição *NdeI Fast Digest* (Thermo Scientific) e *XhoI Fast Digest* (Thermo Scientific), seguindo os protocolos das enzimas. Os produtos da digestão foram visualizados com o auxílio do gel de agarose 0,8 % e os clones positivos de cada variante foram submetidos à reação de sequenciamento utilizando-se o método de Sanger [61] no sequenciador automático 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). A sequência obtida foi analisada com o auxílio da ferramenta de bioinformática *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

Para a caracterização de um fragmento de DNA pelo método de Sanger são necessários os reagentes: DNA molde, enzima DNA polimerase, *primers* do vetor em que o fragmento está inserido, os quatro desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) e os quatro didesoxinucleotídeos trifosfatos (ddNTPs) fusionados a marcadores fluorescentes com cores características. Os ddNTPs são derivados de dNTPs que não possuem o grupo hidroxila 3' (3'-OH). Na primeira etapa, a amostra é aquecida com o objetivo de gerar cadeias do DNA molde de fita simples, nestas os *primers* se anelam levando ao início da síntese da cadeia complementar. A DNA polimerase I organiza os quatro dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) em uma cadeia polinucleotídica complementar que se alonga na direção 5' $\rightarrow$ 3'. Quando ocorre a adição de um ddNTP, a síntese da cadeia é interrompida, uma vez que na ausência da 3'-OH novas ligações fosfodiéster não podem ser formadas. Assim, uma vez que a adição de ddNTPs é aleatória, ao fim da reação são obtidos fragmentos de DNA com diferentes comprimentos. A separação das cadeias de diferentes tamanhos é realizada por eletroforese e a ordem em que os diferentes fragmentos passam pelo detector de fluorescência indica a sequência da cadeia de DNA complementar à cadeia molde [62,63].

Para subclonagem dos fragmentos de interesse, realizaram-se reações de digestão dos plasmídeos recombinantes pGEM T-Easy SEPT12G de ambas as variantes e do vetor de expressão pET28a(+) com as enzimas *NdeI* e *XhoI*. Em seguida, os produtos da digestão foram aplicados em

eletroforese em gel de agarose 0,8 % e as bandas que apresentaram o tamanho correto foram recortadas e purificadas com o kit *Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification Systems* (Promega). A ligação de cada fragmento ao vetor de expressão pET28a(+) foi realizada seguindo o protocolo descrito anteriormente. O produto da reação de ligação foi transformado em células de *Escherichia coli* da linhagem DH5 α . As células foram espalhadas em uma placa de Petri contendo LB sólido e 50 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina. Colônias positivas foram repicadas e crescidas em 5 mL de meio LB líquido na presença de 50 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina. O DNA plasmidial foi extraído e analisado por teste de restrição.

4.1.2 Expressão

Os clones positivos de ambas as variantes foram transformados em células de *E. coli* da linhagem Rosetta(DE3). Uma colônia de cada transformação foi repicada em 5 mL de meio LB líquido contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina e 34 $\mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol e a cultura foi conduzida por 12 h a 37 °C sob agitação de 250 rpm. Em seguida, este pré-inóculo foi diluído para o volume final de 1 L de meio LB contendo os antibióticos. A cultura foi incubada a 37 °C sob agitação de 150 rpm até que fosse atingida uma DO_{600nm} entre 0,6 e 0,8. A expressão foi induzida pela adição de 0,2 mM de IPTG e incubada por 16h a 18 °C, sob agitação de 150 rpm.

As células foram ressuspensas em 40 mL do tampão de lise ou tampão A (50 mM de Tris-Cl pH 8,0; 500 mM de NaCl, 10 % de glicerol, 50 mM de arginina, 50 mM de ácido glutâmico e 10 mM de β -mercaptoetanol). Em seguida, as amostras foram sonicadas (*Fisher Scientific*) durante 7,5 min, sendo 30,0 s *pulse on* e 30,0 s *pulse off*, a 25 % de amplitude. O lisado foi centrifugado por 40 min a 11000 rpm, na temperatura de 4 °C. A fração solúvel e o precipitado após lise (*pellet*) foram analisados por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 15 % (SDS-PAGE). A fração solúvel foi empregada em duas etapas de purificação.

Em experimentos nos quais uma maior concentração da proteína era necessária, o agente redutor utilizado foi o TCEP ao invés do β -mercapto-etanol, sendo que a concentração final deste reagente foi de 5 mM para a lise e 1 mM para as etapas de purificação que serão descritas a seguir.

4.1.3 Purificação

4.1.3.1 Purificação por cromatografia de afinidade

A primeira etapa de purificação foi realizada por cromatografia de afinidade por íons metálicos. Esta técnica baseia-se na afinidade entre íons metálicos imobilizados em uma fase sólida e grupamentos expostos na superfície de biomoléculas em solução, ilustrado na Figura 10. A afinidade pode ser explicada pela possibilidade de formação de ligações de coordenação reversíveis entre o íon metálico quelado e resíduos de aminoácidos, como a histidina que apresenta o grupo imidazol. A histidina é um dos aminoácidos mais utilizados com esse objetivo, uma vez que devido ao seu caráter parcialmente hidrofóbico, poucas proteínas apresentam resíduos de histidinas expostos ao solvente. O vetor de expressão pET28a(+) utilizado neste trabalho apresenta uma região codificante de seis aminoácidos histidinas, região chamada de His-tag, que permite que esta purificação seja realizada. A eluição da proteína é realizada utilizando-se uma solução de imidazol, o agente químico que compete com a proteína pela fase sólida [64].

Figura 10 - Representação da interação entre a His-tag de uma biomolécula e o íon metálico imobilizado em uma matriz sólida.

Fonte: Figura adaptada de Affymetrix Microarray Analysis. 2018. Disponível em <http://www.affymetrix.com/estore/browse/brand/usb/product.jsp?navMode=34000&productId=131367#1_1>.

A coluna foi empacotada utilizando-se 2 mL de resina de níquel (Ni-NTA Sepharose, obtida da QIAGEN), em seguida esta foi lavada com água Milli-Q e equilibrada com o tampão de lise, cuja composição varia de acordo com o objetivo. As etapas de purificação foram:

- a) Aplicação da fração solúvel na coluna de níquel;
- b) Primeira lavagem com 20 mL do tampão A contendo 0,1 % de triton X-100 e 5 mM de imidazol;
- c) Segunda lavagem com 20 mL de tampão A contendo 10 mM de imidazol;
- d) Eluição da proteína de interesse com 10 mL de tampão A contendo 150 mM de imidazol.

Na etapa de eluição, alíquotas de 1 mL foram coletadas e a concentração de proteína foi avaliada pela medida da absorbância em 280 nm, com o auxílio do coeficiente de extinção molar. Este valor foi obtido após a análise da sequência de resíduos de aminoácidos das proteínas na ferramenta de bioinformática *ProtParam Tool*.

4.1.3.2 Purificação por cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia de exclusão por tamanho molecular é uma técnica capaz de separar as proteínas de acordo com o seu volume hidrodinâmico. O empacotamento da coluna é feito utilizando-se uma fase sólida porosa cujas diferentes granulometrias existentes permitem que a técnica seja viável para proteínas com variados volumes hidrodinâmicos. A fase líquida impulsiona a passagem da amostra pela fase sólida. As moléculas maiores são eluídas mais rapidamente, uma vez que não entram nos poros e, assim, percorrem um caminho médio menor até a saída da coluna. Enquanto as proteínas menores são retardadas pelo labirinto de caminhos criados pelos poros [65]. Nesta etapa de purificação, foi utilizada uma coluna Superdex200 (HR 10/30 GE Healthcare) acoplada ao sistema *AKTA purifier* (GE Healthcare). A fase móvel consistiu no tampão A com um fluxo de 0,5 mL/min e a eluição das frações de interesse foi acompanhada pela medida da absorbância em 280 nm. Todas as frações coletadas nas etapas de purificação foram analisadas por SDS-PAGE 15 %.

4.1.3.3 Avaliação do estado oligomérico da SEPT12G humana

A cromatografia de exclusão por tamanho molecular é uma técnica que separa as proteínas de acordo com a sua massa molecular. Desta forma, além de ser uma etapa adicional que permite

aumentar o grau de pureza das amostras, também pode ser utilizada para estimar a massa molecular aparente das proteínas de interesse.

Uma curva de calibração foi construída utilizando-se dois kits contendo marcadores de massa molecular (*GE Healthcare*), de acordo com as instruções do fabricante. O primeiro kit, chamado de *mix A*, era composto das proteínas Ferritina (440 kDa), Conalbumina (75 kDa), Anidrase Carbonica (29 kDa) e Ribonuclease A (13,7 kDa). O segundo kit, *mix B*, apresentava as proteínas Aldolase (158 kDa), Ovalbumina (44 kDa) e Ribonuclease A (13,7 kDa).

A curva de calibração foi construída com base nos valores de K_{av} de cada proteína, este foi calculado conforme representado na equação 1, que considera o volume de eluição de cada proteína (V_e), o volume do *void* da coluna (V_o), determinado pelo volume de eluição do reagente *blue dextran*, e o volume da coluna (V_c), igual a 24 mL.

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

4.1.4 Espectroscopia de Fluorescência

Alguns grupos funcionais presentes em biomoléculas possuem absorções características na região do ultravioleta e visível. Estes são chamados de cromóforos e podem ser rígidos e inflexíveis, possuindo um limitado número de níveis vibracionais permitidos. Quando cromóforos deste tipo absorvem luz, eles não podem voltar ao estado fundamental simplesmente liberando o excesso de energia como calor. Em vez disso, eles passam por uma transição radiativa na qual uma porção deste excesso de energia é reemitido como luz, fenômeno chamado de fluorescência. Uma parte da energia absorvida é perdida em transições entre os níveis vibracionais, assim, a energia emitida é menor que a absorvida e o espectro de emissão ocorre em um maior comprimento de onda [66].

Os mais importantes fluoróforos em proteínas, grupo funcional ou componente que faz com que esta seja fluorescente, são os aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina, sendo que apenas os dois primeiros apresentam espectros de fluorescência com alta intensidade. Uma importante aplicação desta técnica em proteínas é a determinação do ambiente químico experimentado pelos resíduos de triptofano com base no comprimento de onda de emissão de fluorescência. Quando estes resíduos estão enterrados na estrutura, são observados picos em

comprimentos de onda máximos ($\lambda_{\text{máx}}$) próximos a 330 nm, enquanto que quando estes estão expostos ao solvente o $\lambda_{\text{máx}}$ ocorre entre 340 e 350 nm [66].

Após a purificação, realizou-se uma medida de fluorescência intrínseca para a avaliação do enovelamento da proteína. Este experimento foi possível devido à presença de quatro resíduos de triptofano na SEPT12G. O espectro de fluorescência foi obtido excitando-se a amostra em 295 nm e medindo-se a emissão nos comprimentos de onda entre 300 e 450 nm.

4.1.5 Análise do conteúdo de nucleotídeo e ensaio da atividade GTPásica da SEPT12G humana

A análise do conteúdo de nucleotídeo foi realizada pela desnaturação da proteína de interesse com ácido perclórico para extração dos nucleotídeos, seguindo o método descrito por Seckler et al. [67]. Aliquotas de 500 μL contendo 15 μM de SEPT12G foram incubadas durante 10 min no gelo com 250 μL de uma solução 1,5 M de HClO_4 para desnaturação da proteína. Ao fim do período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g por 10 min a 4 °C. Em seguida, transferiu-se 600 μL da fração solúvel para um microtubo de 1,5 mL ao qual foram adicionados 100 μL de K_2HPO_4 1 M, 100 μL de KOH 3 M e 80 μL de CH_3COOH 5 M. Estas soluções foram utilizadas com o objetivo de neutralizar e tamponar a fração solúvel. As alíquotas foram mantidas a - 20 °C até a análise em cromatografia de troca iônica.

Para o ensaio da atividade GTPásica, incubou-se 15 μM de SEPT12G com 45 μM de GTP, na presença de 5 mM de MgCl_2 . A amostra foi incubada a 20 °C e alíquotas de 500 μL foram retiradas nos tempos de 0, 5, 10, 30, 60, 90, 120 e 160 min e congeladas imediatamente utilizando-se nitrogênio líquido para a interrupção da reação. Essas alíquotas foram descongeladas e submetidas ao processo de desnaturação com ácido perclórico descrito acima.

As amostras foram descongeladas e centrifugadas por 10 min a 4 °C sob rotação de 13000 x g para análise por cromatografia de troca iônica, utilizando-se a coluna de troca aniônica *Protein Pack DEAD-5Pw*, 7,5 x 75 mm (*Waters*) acoplada a um sistema de HPLC. A fase móvel empregada foi uma mistura do tampão 1 (Tris_HCl 50 mM pH 8,0) e tampão 2 (Tris-HCl 50 mM pH 8,0 com 1 M de NaCl), com o objetivo de criar um gradiente de NaCl, conforme descrito na Tabela 4. Foi utilizado um fluxo de 1 mL/min, a 25 °C e a eluição dos nucleotídeos foi monitorada pela absorbância em 253 nm.

Nesta técnica, é necessário retirar os aminoácido arginina do tampão, uma vez que este possui absorção em 253 nm e é eluído próximo ao volume observado para o GDP. Desta forma, na última etapa da purificação o tampão A foi substituído pelo tampão B (50 mM de Tris-HCl pH 8,0; 500 mM de NaCl, 10 % de glicerol e 10 mM de β -mercaptoetanol).

Tabela 4 - Step gradiente de NaCl utilizado na cromatografia de troca aniônica. Para a análise do teor de nucleotídeos e ensaio da atividade GTPásica.

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

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.5.1 Curva de calibração para GDP

As amostras utilizadas para a construção da curva de calibração foram do nucleotídeo GDP diluído no Tampão B para as concentrações finais de 110; 90; 55; 45; 35; 27,5; 22,5 e 13,75 μ M. Em seguida, as amostras foram tratadas pelo método de desnaturação por ácido perclórico, descrito no item 4.1.5 e submetidas à cromatografia de troca iônica. A absorbância em 253 nm foi medida e a curva de calibração foi construída utilizando-se o valor da absorbância *versus* a concentração da amostra. Amostras da proteína SEPT12G nas concentrações de 40,5; 93; 94,5 e 113,4 μ M foram submetidas ao mesmo método e, com base na sua absorbância, os valores de massa molecular foram obtidos com auxílio da equação da reta.

4.1.6 Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

A calorimetria de varredura diferencial permite caracterizar a estabilidade de uma proteína através de medidas da alteração da capacidade calorífica à pressão constante (C_p) em função da alteração da temperatura. Nesta técnica, as celas de amostra e de referência são aquecidas a uma taxa constante e a quantidade de calor necessária para aquecer ou resfriar a cela de amostra até a

temperatura da cela de referência é medida. Um típico sinal de DSC está ilustrado na Figura 11, a área em baixo da curva resulta no valor da variação de entalpia durante a transição térmica (ΔH), o ponto máximo da curva é o valor da temperatura de *melting* (T_m) e a diferença entre o sinal após a transição térmica e antes da transição representa a ΔC_p .

Figura 11 - Curva esperada para o experimento de DSC. Típico resultado para a desnaturação térmica de uma proteína. Os parâmetros obtidos no experimento são: temperatura de *melting* (T_m), variação da capacidade calorífica à pressão constante (ΔC_p) e a variação da entalpia (ΔH).

Fonte: Sheehan, D., 2009.

As medidas foram realizadas em um microcalorímetro (Microcal). As celas de amostra e referência, cujo volume é igual a 500 μL , foram preenchidas com a amostra e o tampão, respectivamente, sendo que a amostra estava nas concentrações de 18,6 e 29,7 μL . O sistema foi aquecido de 15 a 65 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de 90 $^{\circ}\text{C}/\text{h}$.

4.1.7 Ensaios de cristalização

Para que ocorra a formação de um cristal, as moléculas proteicas devem atingir um ponto de supersaturação, na qual as moléculas experimentam um equilíbrio entre a fase sólida e a fase líquida. Desta forma, o processo de cristalização de proteínas é dependente, principalmente, das propriedades de solubilidade que estas apresentam. Com o objetivo de favorecer o crescimento de cristais, algumas propriedades são variadas, tais como estabilidade, pH, temperatura, concentração, natureza dos reagentes precipitantes, força iônica do meio, entre outras [68,69].

Desta forma, os ensaios de cristalização foram realizados utilizando-se o kit de cristalização *Morpheus (Molecular Dimensions)* que contém 96 condições onde são variados o pH, a solução tampão, os aditivos e os agentes precipitantes. Os ensaios de cristalização foram realizados de forma automatizada pelo robô *Crystal Gryphon* em câmara termoestável a 18 °C utilizando o método de difusão de vapor *sitting drop* (gotas sentadas), ilustrado na Figura 12. Neste método a gota, contendo a solução de proteína e o solvente do reservatório é adicionada em um poço elevado em relação ao reservatório, que contém a solução tamponante, o agente precipitante e os aditivos. Com a difusão de vapor o volume da gota diminui, aumentando a concentração dos agentes precipitantes e da proteína, até que o equilíbrio osmótico aconteça, favorecendo a nucleação e o crescimento dos cristais [68,69].

Soluções da SEPT12G nas concentrações de 2 e 4 mg/mL foram incubadas com dez vezes excesso dos nucleotídeos GDP e GMPPNP na presença e ausência de Mg^{2+} e, em seguida, 200 μ L foram adicionados nos poços.

Figura 12 - Método de cristalização. Difusão de vapor: gota sentada.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.8 Resolução das estruturas

Os conjuntos de dados obtidos para a SEPT12G ligada aos nucleotídeos GDP e GMPPNP foram coletados na linha I24 do *Diamond Light Source* (Didcot, Inglaterra). Os dados foram processados com os programas *XIA2 DIALS* e *XIA2 3d*. Em seguida, as estruturas foram resolvidas por substituição molecular utilizando-se a estrutura cristalográfica da proteína homóloga e membro de seu subgrupo SEPT3G, depositada no banco de dados *Protein Data Bank* sob o código de acesso

4Z51. A substituição molecular foi realizada no programa *Phaser MR* do pacote *CCP4i*. Após a obtenção das estruturas, ciclos de refinamento foram realizados com o auxílio dos programas *phenix.refine* do pacote *Phenix*, visualizadas e manipuladas em espaço direto usando o *Coot*. As figuras mostradas nesta dissertação foram geradas com o auxílio do programa *PyMOL*.

4.2 Domínio de ligação ao nucleotídeo dos mutantes SEPT12G^{T89M} e SEPT12G^{D197N}

4.2.1 Obtenção dos mutantes da SEPT12G

Os DNAs que codificam os mutantes da SEPT12G foram obtidos com base na estratégia desenvolvida pela *Agilent Technologies* para produção de mutações sítio-dirigidas (QuickChange II Site-Directed Mutagenesis). Neste método, a enzima *PfuUltra high-fidelity DNA polymerase* é utilizada para realizar a replicação dirigida por *primers* de ambas as cadeias plasmídicas com alta fidelidade. Os *primers* utilizados contêm a mutação de interesse, que podem ser inserções e deleções de aminoácidos ou mutações pontuais. Após o anelamento, os *primers* são estendidos durante os ciclos de temperatura pela *PfuUltra high-fidelity DNA polymerase*, sem que ocorra o seu deslocamento. A extensão destes gera um plasmídeo completo, exceto pela presença de um *nick* (uma quebra no esqueleto fosfodiéster da cadeia crescente). Em seguida, o produto é tratado com a endonuclease DpnI que é específica para clivagem do DNA metilado e hemimetilado. O DNA isolado de quase todas as linhagens de *E. coli* são *dam* metilados e, assim, susceptíveis à clivagem, selecionando apenas os DNAs em que a mutação foi inserida. A transformação em células de *E. coli* da linhagem DH5 α corrige os *nicks* presentes nos DNAs mutados [70].

A construção final da SEPT12G clonada no vetor de expressão pET28a(+) foi utilizada como molde para a produção dos mutantes (SEPT12^{T89M} e SEPT12^{D197N}). Para cada reação de amplificação foram utilizados 50 ng de DNA, 250 ng de cada *primer*, 20 μ L de 5X *Reaction Buffer* (TransGen Biotech), 2 μ L de 10 mM de dNTPmix, 2 μ L da enzima TransStart FastPfu Fly DNA Polymerase (TransGen Biotech) e água Milli-Q para 100 μ L. Após sua preparação, a reação foi dividida em 5 microtubos contendo 20 μ L de amostra. Os *primers* utilizados foram desenhados seguindo as orientações da Stratagene, Tabela 5. Os ciclos de aquecimento, realizados com o auxílio de um termociclador (*Applied Biosystems*), foram realizados de acordo com as orientações do fabricante, Tabela 6. As temperaturas de anelamento testadas foram de 55, 61, 63, 68 e 70 °C para cada mutação.

Tabela 5 - Primers utilizados na produção dos mutantes de SEPT12 pelo método da mutagênese sítio dirigida.

<i>Primers</i>	<i>Mutação</i>	<i>Sequência</i>
g589a_antisense	SEPT12G ^{D197N}	5'tgattgccaggccaacagcctgaccatg3'
g589a	(Asp197Asn)	5'catggtcaggtgttggccctggcaatca3'
c266t_antisense	SEPT12 ^{T89M}	5'cagctgcagcatctgggggtgtgggca3'
c266t	(Thr89Met)	5'tgcccacaccccagatgctgcagctg3'

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 6 - Ciclos de aquecimento da reação de mutagênese sítio-dirigida.

Segmento	Temperatura (°C)	Duração (min:seg)	Número de ciclos
1	95	0:30	1
2	95	0:30	18
	Temperatura de anelamento	1:00	
	68	1:00	
	4	Infinito	

Fonte: Elaborada pela autora.

Em seguida foram adicionados a cada amostra 2,3 μ L do tampão tango (Thermo Scientific) e 0,3 μ L da enzima *DpnI* (Thermo Scientific). A mistura foi mantida por 3 h a 37 °C. Ao fim da incubação, a amostra foi transformada em DH5 α . Colônias foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo 50 μ g/mL de canamicina e o DNA plasmidial foi extraída, purificado e sequenciado.

4.2.2 Expressão e purificação dos mutantes da SEPT12G

As etapas de expressão e purificação de ambos os mutantes foram realizadas de acordo com o descrito para a SEPT12G nos itens 4.1.2 e 4.1.3.1, sendo que para os mutantes apenas a etapa de purificação por cromatografia de afinidade foi realizada, uma vez que a proteína foi obtida a baixa concentração e, assim, uma etapa adicional iria diluir a amostra.

4.2.3 Ensaios de cristalização

Os ensaios de cristalização foram realizados utilizando-se o kit *Morpheus (Molecular Dimensions)*, análogo ao descrito no item 4.1.7. A proteína SEPT2G^{T89M} na concentração de 0,8 mg/mL foi incubada com dez vezes excesso dos nucleotídeos GDP e GMPPNP na presença e ausência de Mg²⁺.

4.3 Heterodímero SEPT7-SEPT12

4.3.1 Clonagem e expressão

Os experimentos de coexpressão foram realizados com as proteínas SEPT12G e SEPT7NGc, sendo que a última já estava disponível como um plasmídeo recombinante no grupo de pesquisa (pETDuet-1 SEPT7NGc). Neste clone estão inseridas as regiões N-terminal e o domínio central e uma parte do domínio C-terminal, uma vez que este na sua totalidade resultava na degradação da proteína. Para representar que a região C-terminal não está completa, optou-se por escrever o nome do clone usando a letra c minúscula. O DNA que codifica a proteína SEPT12G foi subclonado no vetor de expressão bicistrônico pETDuet-1, onde a SEPT7NGc já estava inserida. Este vetor possui dois sítios de múltipla clonagem permitindo a inserção e expressão das duas proteínas de interesse. Em seguida, a ligação foi transformada em células de *E. coli* da linhagem DH5 α e, após o crescimento das células, o DNA plasmidial foi extraído, purificado e avaliado pela análise de restrição com as enzimas de restrição *NdeI/XhoI Fast Digest* (*Thermo Scientific*) para a SEPT12G. Os experimentos de expressão foram conduzidos de acordo com o descrito no item 4.1.2 para a SEPT12G.

4.3.2 Purificação

A primeira e segunda etapa de purificação das proteínas foi realizada por cromatografia de afinidade e exclusão molecular, respectivamente, conforme descrito no item 4.1.3 para a SEPT12G. No primeiro teste, o tampão A foi empregado nas etapas de lise e purificação, enquanto no segundo foi utilizado o tampão C (50 mM de Tris-Cl pH 8,0; 300 mM de NaCl, 10 % de glicerol, 50 mM de arginina, 50 mM de ácido glutâmico e 10 mM de β -mercaptoetanol) nessas etapas. Alíquotas de 1 mL foram retiradas separadamente para medida da concentração. A análise dos

processos de expressão e purificação foram realizados por eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % (SDS-PAGE).

4.3.3 Análise do estado oligomérico por cromatografia de exclusão por tamanho molecular acoplada a análise do espalhamento de luz em vários ângulos (SEC-MALS)

A cromatografia de exclusão por tamanho molecular (SEC, do inglês *size exclusion chromatography*) separa moléculas de acordo com o seu volume hidrodinâmico e, assim, permite a determinação da massa molecular quando uma curva de calibração utilizando diferentes padrões globulares é utilizada. No entanto, esta determinação apresenta falhas quando proteínas não globulares são medidas.

A utilização da cromatografia de exclusão por tamanho molecular acoplada à análise da dispersão de luz em vários ângulos (MALS, do inglês *multi angles light scattering*), permite a determinação da massa molecular absoluta de uma molécula em solução. Nesta técnica, é utilizada uma fonte de luz colimada com comprimento de onda igual a 659 nm, ou seja, de frequência única e luz polarizada, o que define um laser. Quando o laser incide na solução contendo uma suspensão de macromoléculas o campo elétrico oscilante da luz induz um dipolo momentâneo na macromolécula. Este dipolo é capaz de re-irradiar a luz. Desta forma, a intensidade da luz irradiada depende da magnitude do dipolo induzido na macromolécula [71].

Quando existem muitas moléculas em solução, cada molécula dispersa a luz por meio do mecanismo do dipolo induzido. E, assim, a intensidade da luz dispersa é proporcional à concentração das moléculas em solução [71].

O espalhamento é coerente, ou seja, a luz difusa do dímero é duas vezes mais intensa que a luz total espalhada por dois monômeros independentes. Assim, a intensidade da luz dispersa por uma molécula é diretamente proporcional à massa molecular [71].

Após a purificação das amostras em cromatografia de afinidade e exclusão por tamanho molecular, a proteína foi concentrada até o valor de 2,3 mg/mL. Em seguida, 30 uL foram injetados em uma coluna Superdex200 analítica acoplada aos sistemas mini DAWN TREOS (Wyatt Technologies) e OptiLab. O primeiro realiza a leitura do espalhamento estático da luz a 3 diferentes ângulos (43,6°; 90,0°; 136,4°). Em seguida, o módulo OptiLab faz a medida do índice de refração diferencial (dRI). Por meio do software ASTRA 7 (Wyatt Technology) as leituras podem ser

acompanhadas em tempo real e os cálculos matemáticos envolvidos na determinação da massa molecular são realizados.

4.3.4 Análise do conteúdo de nucleotídeo

A análise do conteúdo de nucleotídeo foi realizada pela desnaturação da proteína com ácido perclórico, método descrito por Seckler. et. al [67], e análise por cromatografia de troca iônica, conforme descrito no item 4.1.5. As amostras do heterodímero SEPT7NGc-SEPT12 estavam nas concentrações de 1,1 e 1,4 mg/mL.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Domínio de ligação ao nucleotídeo da SEPT12 humana

5.1.1 Clonagem e expressão

Pesquisa realizada no banco de dados *GenBank* do portal NCBI resultou em duas variantes para a SEPT12 reportadas em tecidos de testículos, sendo que a variante 2 apresentava um maior número de citações em trabalhos que estudavam a imunolocalização desta em filamentos formados por septinas. A primeira diferença observada entre elas foi a ausência de 123 pb no meio do domínio G da variante 1, domínio mais conservado na família das septinas, conforme representado na Figura 13.

Figura 13 - Sequências codificantes do domínio G das variantes 1 e 2 da SEPT12. Alinhamento realizado com o auxílio da ferramenta de bioinformática Clustal Omega.

```
v2      MDPLRRSPSPCLSSQPSSPSTPPCEMLGPVGIEAVLDQLKIKAMKMGFEFNIMVVGQSGL
v1      MDPLRRSPSPCLSSQPSSPSTPPCEMLGPVGIEAVLDQLKIKAMKMGFEFNIMVVGQSGL
*****

v2      GKSTMVNTLFKSKVWKSNNPPGLGVPTPQTLQLHSLTHVIEEKGVKCLKLTVDTDPGFGDQI
v1      GKSTMVNTLFKSKVWKSNNPPGLGVPTPQTLQLHSLTHVIEEKGVKCLKLTVDTDPGFGDQI
*****

v2      NNDNCWDPILGYINEQYEQYLQEEILITRQRHIPDTRVHCVVFPPTGHCLRPDIEFL
v1      NNDNC-----LRPLDIEFL
*****

v2      QRLCRTVNVVPIARADSLTMEEREAFRRRIQQNLRTHCIDVYPQMCDEDINDKILNSK
v1      QRLCRTVNVVPIARADSLTMEEREAFRRRIQQNLRTHCIDVYPQMCDEDINDKILNSK
*****

v2      LRDRIPFAVVGADQEHVNGRCVLGRKTKWGIIEVENMAHCEFPLLRDLLIRSHLQDLKD
v1      LRDRIPFAVVGADQEHVNGRCVLGRKTKWGIIEVENMAHCEFPLLRDLLIRSHLQDLKD
*****

v2      ITHNIHYENYRVIRLNESHLLPRGPGWNLAPASPGQLTTPRTFKVCRGAHDDSDDEF
v1      ITHNIHYENYRVIRLNESHLLPRGPGWNLAPASPGQLTTPRTFKVCRGAHDDSDDEF
*****
```

Fonte: Clustal Omega.

A amplificação dos domínios de ligação ao nucleotídeo da SEPT12 (SEPT12G) foi realizada em três etapas para a variante 1 e em uma etapa para a variante 2. Os fragmentos amplificados, ilustrados na Figura 14, possuem tamanhos próximos aos esperados de 233 pb para a reação 1, 447 pb para a reação 2, 684 pb para a reação 3 e 822 pb para a reação 4.

Figura 14 - Clonagem dos DNAs referentes às variantes 1 e 2 da SEPT12G. Produtos obtidos nas reações de PCR: **M)** marcador 1 kb DNA Ladder (Promega); **1)** produto da reação 1; **2)** produto da reação 2; **3)** produto da reação 3 e **4)** produto da reação 4.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após a clonagem dos fragmentos de interesse no vetor de propagação pGEM T-Easy e análise da integridade dos clones pelo sequenciamento, estes foram subclonados no vetor de expressão pET28a(+). A análise de restrição realizada após a obtenção dos clones demonstrou a presença dos fragmentos de interesse inseridos no vetor pET28a(+) para ambas as construções finais das variantes 1 e 2, conforme observado na Figura 15.

Figura 15 - Análise de restrição dos clones de SEPT12 em pET28a(+). Nos géis estão representados: **M)** marcador 1 kb DNA Ladder; **1)** variante 2 e **2)** variante 1.

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise do domínio de ligação ao nucleotídeo da SEPT12 na ferramenta de bioinformática *ProtParam Tool*, mostrou que as variantes apresentam diferentes características químicas. A variante 1 possui 228 aminoácidos, massa molecular igual a 26,2 kDa e coeficiente de extinção molar, considerando todas as cisteínas reduzidas (ϵ), igual a $15.470 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Enquanto

a variante 2 possui 274 aminoácidos, massa molecular igual a 31,7 kDa e ϵ igual a $26.930 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Os experimentos de expressão das duas variantes demonstrou que ambas as variantes podem ser expressas pelo método empregado, no entanto apenas a variante 2 apresentou considerável solubilidade, enquanto a variante 1 foi expressa totalmente insolúvel, conforme observado na Figura 16. A obtenção da estrutura cristalográfica da SEPT12 permitiu uma análise dos elementos de estrutura secundária que estão faltando na variante 1 e que poderiam estar desestabilizando-a. Estes resultados serão descritos posteriormente. Com base nos ensaios de expressão, optou-se por trabalhar com a variante 2 para os experimentos biofísicos e de cristalização.

Figura 16 - Análise da expressão da SEPT12G. A) variante 1 e B) variante 2. SDS-PAGE 15 %: **M)** padrão de massa molecular; **1)** proteínas totais de *E. coli* após a indução; **2)** fração solúvel após lise e **3)** fração insolúvel após lise.

Fonte: Elaborada pela autora

5.1.2 Purificação da SEPT12G humana variante 2

A purificação da SEPT12G em cromatografia de afinidade resultou em amostras com rendimento de 1,5 a 4 mg/mL para 1 L de meio de cultura. As frações de cada etapa da purificação foram coletadas e analisadas em SDS-PAGE 15 %, ilustrado na Figura 17. Conforme podemos observar, a purificação resultou em uma amostra com massa molecular próxima do esperado (31,7 kDa) e elevado grau de pureza.

Figura 17 - Análise da purificação da SEPT12G variante 2. No SDS-PAGE 15 % estão representados: M) padrão de baixa massa molecular; 1) proteínas totais de *E. coli* após indução; 2) fração solúvel após a lise; 3) *pellet* após a lise; 5) lavagem 1; 5) lavagem 2; 6) primeiro volume obtido na eluição com 150 mM de imidazol e 7) segundo volume na eluição.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.3 Avaliação do estado oligomérico da SEPT12G humana

A técnica de cromatografia de exclusão por tamanho molecular foi utilizada com dois objetivos: o de fornecer uma purificação adicional e estimar a massa molecular aparente da proteína. Após a etapa de cromatografia de afinidade, uma alíquota de 1 mL da SEPT12G foi submetida à cromatografia de exclusão molecular. A eluição foi acompanhada pela medida da absorbância em 280 nm e o cromatograma obtido, Figura 18A, demonstrou que a SEPT12G foi obtida com um alto grau de pureza e homogeneidade.

Figura 18 - Avaliação do estado oligomérico da SEPT12G. **A)** Purificação da SEPT12G em cromatografia de exclusão molecular; **B)** Curva de calibração em coluna Superdex200; **C)** Análise das duas etapas de purificação em SDS-PAGE 15 %. No gel está representado: M) marcador de baixo peso molecular; 1) proteínas totais de *E. coli* antes da indução; 2) proteínas totais de *E. coli* após a indução; 3) fração solúvel após a lise; 4) fração insolúvel após a lise; 5) proteína que não ligaram à resina de afinidade; 6) lavagem 1; 7) lavagem 2; 8) eluição em cromatografia de afinidade; 9) eluição em cromatografia de exclusão molecular, fração coletada em 16 mL; 10) fração coletada em 21 mL; 11) fração coletada em 26 mL.

Fonte: Elaborada pela autora.

Conforme observado na Figura 18A, o volume de eluição da proteína de interesse foi de 16 mL, o que foi confirmado pela análise em SDS-PAGE 15 % ilustrada na Figura 18C. O pico que aparece em volume de eluição igual a 21 mL corresponde à eluição do imidazol, uma vez que sua análise em SDS-PAGE não apresentou banda proteica. Assim, como apenas um pico referente à proteína SEPT12G foi detectado, conclui-se que a proteína possui apenas um estado de oligomerização.

Com o objetivo de estimar a massa molecular da SEPT12G, utilizaram-se proteínas globulares padrão para a construção de uma curva de calibração, ilustrada na Figura 18B.

Calculou-se a reta que melhor ajusta os pontos da curva de calibração, obtendo-se a seguinte equação da reta: $y = 0,9573 - 0,288x$. O valor de K_{AV} obtido para a SEPT12G foi de 0.53 que corresponde à massa molecular aparente de 30,2 kDa para a variante 2, sendo que o valor esperado era de 31,7 kDa. Este valor corresponde, portanto, a um monômero. Resultado similar ao que foi obtido para as proteínas SEPT3 e SEPT9, pertencentes ao subgrupo da SEPT12 [57,72].

5.1.4 Espectroscopia de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência foi utilizada com o objetivo de obter informações sobre o enovelamento da proteína. Medidas da fluorescência intrínseca dos resíduos de triptofano, experimento possível devido à presença de 4 resíduos na estrutura primária da SEPT12G, foram realizadas excitando a amostra em 295 nm e medindo-se a emissão nos comprimentos de onda entre 300 e 450 nm. Como podemos observar na Figura 19, um pico em 330 nm foi obtido, indicando que os resíduos de triptofano não estão, em sua maioria, em contato com o solvente e, portanto, em um ambiente químico hidrofóbico com alto grau de estruturação, sugerindo que a proteína está enovelada. O espectro não é simétrico devido às diferentes contribuições dos quatro resíduos de triptofano presentes na estrutura primária da SEPT12. A espectroscopia de fluorescência foi utilizada para avaliar o enovelamento da proteína, uma vez que técnicas mais apropriadas, como dicroísmo circular, não eram compatíveis com a amostra. A SEPT12G apresentou interação com a resina da coluna Superdex200 utilizada para a segunda etapa de purificação, sendo possível sua purificação apenas em tampão contendo 50 mM de arginina. Uma vez que a arginina apresenta uma alta absorção na região espectral analisada pelo dicroísmo circular, esta técnica não foi utilizada.

Figura 19 - Espectro de emissão fluorescente da SEPT12G. Obtido após a incidência de luz no comprimento de onda igual a 280 nm.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.5 Análise do conteúdo de nucleotídeo e ensaio da atividade GTPásica da SEPT12G humana

A expressão das septinas pode produzir proteínas ligadas ou não aos nucleotídeos oriundos das bactérias. Desta forma, realizou-se a análise do conteúdo de nucleotídeo da SEPT12G. Uma alíquota da proteína purificada em cromatografia de afinidade foi desnaturada com o objetivo de liberar os possíveis nucleotídeos. O perfil de eluição está ilustrado na Figura 20A e, como podemos observar, a SEPT12G foi expressa com o nucleotídeo GDP ligado a ela.

Em seguida, a avaliação da ligação e hidrólise de GTP, Figura 20B, foi feita incubando-se a proteína com excesso de GTP e coletando alíquotas em intervalos de tempo específicos. Neste experimento, observou-se que 15 μ M de SEPT12G foram capazes de hidrolisar todo o conteúdo de nucleotídeo adicionado, 45 μ M de GTP, em cerca de 2 h.

Os resultados obtidos complementam os ensaios de teor de nucleotídeo e atividade GTPásica para as septinas que formam este grupo (SEPT3, SEPT9 e SEPT12). Em relação ao teor de nucleotídeo, nota-se uma grande diferença entre a SEPT12 e as demais componentes de seu grupo, uma vez que esta não é expressa na forma apo (sem nucleotídeo ligado) como foi observado para os demais membros. Outro fator que chama a atenção, é que a presença do nucleotídeo não induziu a formação de um dímero como foi observado para a SEPT3 [57], pois como podemos ver

na Figura 20A, a avaliação do estado oligomérico utilizando cromatografia de exclusão por tamanho molecular resultou em um monômero de massa molecular igual a, aproximadamente, 30,2 kDa. Isto pode demonstrar que embora a dissociação do nucleotídeo seja mais lenta, ela ocorre [57,72].

Observa-se também que a SEPT12G hidrolisa o nucleotídeo em uma velocidade esperada para o seu subgrupo, uma vez que as proteínas SEPT3 e SEPT9 foram capazes de hidrolisar todo o conteúdo de nucleotídeo (60 μ M de nucleotídeo para 20 μ M de proteína) em 1 e 3 h, respectivamente [57,72]. Entretanto, a presença de GDP ligado à proteína pode influenciar nos resultados obtidos para o ensaio da atividade GTPásica e interação proteína-ligante, impedindo cálculos precisos da velocidade de hidrólise.

Figura 20 - Perfil cromatográfico dos nucleotídeos de guanina em coluna de troca iônica DEAE-5PW. A) avaliação do conteúdo de nucleotídeo; B) análise da atividade GTPásica.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.5.1 Curva de calibração GDP

A obtenção da curva de calibração utilizando-se amostras de GDP diluídas no tampão B, ilustrada na Figura 21, resultou em uma equação da reta igual a: $y = 742,82x - 1,18$. As medidas de absorbância para as amostras da SEPT12G de diferentes preparações em variadas concentrações foram utilizadas para o cálculo da porcentagem de nucleotídeo ligado, com o auxílio da equação da reta. Os valores obtidos estão descritos na Tabela 7, como podemos observar a SEPT12G

apresentou diversas porcentagens de saturação, no entanto nunca esteve totalmente ligada ao nucleotídeo GDP. Além disso, vale ressaltar que a afinidade por GDP para as demais proteínas membros de seu subgrupo (SEPT3 e SEPT9) é baixa [57,72], o que também pode explicar o fato de nem todas as moléculas da SEPT12G estarem ligadas ao nucleotídeo.

Figura 21 - Curva de calibração de GDP para avaliação da porcentagem de saturação da SEPT12G.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 7 - Valores obtidos para a análise da porcentagem de saturação da SEPT12G.

Concentração da SEPT12G (μM)	Absorbância em 253 nm (u.a)	Concentração de GDP (μM)	Porcentagem de GDP (%)
40,50	0,030	21,40	53,00
93,00	0,038	27,30	29,30
94,50	0,053	38,40	40,40
113,40	0,054	39,30	34,60

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.6 Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

A técnica de calorimetria de varredura diferencial foi utilizada com o objetivo de ter uma estimativa da temperatura em que a transição térmica da proteína SEPT12G ocorre, para auxiliar na utilização da proteína nos procedimentos de laboratório, uma vez que esta proteína apresenta

uma alta instabilidade. As amostras da proteína utilizada foram provenientes da purificação em cromatografia de exclusão molecular nas concentrações de 18,6 e 29,7 μM , Figura 22A e 22B, respectivamente. Os parâmetros termodinâmicos que podem ser obtidos com este experimentos são a variação de entalpia durante a transição térmica (ΔH), o C_p e a T_m (temperatura de *melting*).

No entanto, apenas o T_m foi considerado, uma vez que obtivemos valores de ΔH menor para a proteína mais concentrada, fazendo com que estes valores não sejam confiáveis. Além disso, logo após a transição térmica a proteína precipitou e, assim, a linha de base não foi reestabelecida. Como o C_p é calculado pela diferença entre a linha de base após a transição e a linha de base antes da transição térmica, este parâmetro não foi obtido. Os valores obtidos para o T_m foram de 33 e 34,7 $^{\circ}\text{C}$ para a proteína de menor e maior concentração, respectivamente. Este resultado demonstra a baixa estabilidade térmica apresentada pela SEPT12G que dificulta aplicação desta em experimentos em que a amostra deva ser aquecida ou que a amostra necessite ficar incubada à temperatura ambiente por bastante tempo, como por exemplo, em ensaios de interação com o nucleotídeo.

Figura 22 - Termogramas obtidos para a SEPT12G. Amostras da proteína SEPT12G nas concentrações de 18,6 μM (A) e 29,7 μM (B).

A)

B)

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.7 Estrutura cristalográfica da SEPT12G

Um dos objetivos iniciais deste trabalho foi o de obter informações estruturais do heterodímero composto pela SEPT7-SEPT12, no entanto os ensaios de cristalização realizados resultaram em cristais contendo apenas a SEPT7, estrutura que já havia sido determinada pelo nosso grupo de pesquisa em uma maior resolução. Acredita-se que a condição de cristalização pode ter influenciado na interação das proteínas e que a SEPT12G possa ter precipitado, fazendo com a SEPT7 estivesse em excesso na gota.

Os ensaios de cristalização da SEPT12G resultaram em cristais, ilustrados na Figura 23, em três condições: GDP na presença e ausência de $MgCl_2$ e GMPPNP na presença de $MgCl_2$. No entanto, a condição utilizada para os ensaios de GDP sem o Mg^{2+} continha diversos cátions divalentes na solução de cristalização e, desta forma, o íon Mg^{2+} estava presente na estrutura cristalográfica obtida. Dados de difração foram coletados na linha I24 do *Diamond Light Source* (Didcot, Inglaterra) e foram obtidos conjuntos de alta resolução para todos os cristais, que permitiram a resolução das estruturas correspondentes. Os cristais difrataram a resolução entre 1,9 a 2,4 Å.

Figura 23 - Cristais da SEPT12G. Exemplos de cristais obtidos para a condição G2 do kit de cristalização *Morpheus*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Foram obtidas quatro estruturas, duas para a SEPT12G complexada a GMPPNP em dois grupos espaciais diferentes (C222₁, estrutura chamada de GMPPNP1, e P1, estrutura chamada de GMPPNP2), uma para a SEPT12G complexada a GDP (grupo espacial P1) e uma para o mutante SEPT12G^{T89M} complexada a GDP (grupo espacial C121). As condições de cristalização do kit *Morpheus* estão descritas na Tabela 8. Os cristais que resultaram em ambas as estruturas não foram obtidos para a mesma condição de cristalização e, assim, devido ao diferente processo de

empacotamento cristalino, não apresentam o mesmo grupo espacial. Uma outra característica que evidencia o fato de que os grupos de simetria não são relacionados é que apenas a estrutura SEPT12G-GMPPNP2 forma filamentos quando operações de translação da unidade assimétrica são realizadas, resultado que será mostrado na seção 5.1.7.2.

Tabela 8 - Condições de cristalização do kit Morpheus em que foram obtidos cristais da SEPT12G.

Estrutura	Poço	Mix de precipitantes	Mix de aditivos	Sistema tampão
SEPT12 GMPPNP1	G2	10 % PEG 8000 20 % etileno glicol	0,02 M de cada ácido carboxílico*	0,1 M MÊS/imidazol pH 6,5
SEPT12 GMPPNP2	D10	10 % PEG 8000 20 % etileno glicol	0,02 M de cada álcool*	0,1 M de <i>bicine/Trizma</i> <i>base</i> pH 8,5
SEPT12 GDP	A12	12,5 % PEG 1000 12,5 % PEG 3350 12,5 % MPD	0,03 M de cada cátion divalente*	0,1 M de <i>bicine/Trizma</i> <i>base</i> pH 8,5
SEPT12 ^{T89M} GDP	E11	10 % PEG 4000 20 % glicerol	0,03 M de cada etileno glicol*	0,1 M de <i>bicine/Trizma</i> <i>base</i> pH 8,5

* a composição de cada *mix* pode ser encontrada no manual do fabricante.

Fonte: Elaborada pela autora.

A estrutura cristalográfica da SEPT12G complexada ao nucleotídeo GMPPNP pertencendo ao grupo espacial C222₁ do sistema ortorrômbico (chamada de SEPT12G-GMPPNP1), apresenta um único monômero na unidade assimétrica, conforme apresentado na Figura 24A. Já a SEPT12G complexada ao nucleotídeo GMPPNP pertencente ao grupo espacial P1 do sistema triclinico (chamada de SEPT12G-GMPPNP2), apresenta quatro monômeros na unidade assimétrica, Figura 24B. O refinamento das estruturas foi realizado com os programas *phenix.refine* do pacote Phenix e *Coot* do pacote CCP4, resultando em valores de R_{free} e R_{work} de, aproximadamente, 0,19 e 0,24 para cada estrutura, na Tabela 9 encontram-se representados todos os parâmetros do refinamento.

Algumas regiões apresentaram densidades eletrônicas fracas que não permitiam sua interpretação em termos de posições atômicas e, assim, os resíduos correspondentes estão faltando

no modelo final. Estas regiões ocorrem em *loops* flexíveis. Para a SEPT12G-GMPPNP1 a região ocorre entre os resíduos 228-230, enquanto para a SEPT12G-GMPPNP2 elas ocorrem em 82-85 e 102-103 para a cadeia A, 81-84 para a cadeia B, 80-85 para a cadeia C e 81-84 e 230-234 para a cadeia D.

A estrutura cristalográfica da SEPT12 complexada a GDP (chamada de SEPT12G-GDP) pertence ao grupo espacial P1 do sistema triclinico. Esta estrutura foi refinada até valores de R_{free} e R_{work} similares aos obtidos com os complexos de GMPPNP, descritos na Tabela 9. A tabela indica também que as estruturas da SEPT12G-GMPPNP2 e SEPT12G-GDP são isomorfas. Na unidade assimétrica desta estão presentes quatro monômeros, Figura 24C, muito parecido com o observado no caso SEPT12-GMPPNP2, Figura 24B. As falhas na continuidade da cadeia polipeptídica ocorrem nas regiões 80-85 na cadeia A, 81-84 e 102-103 na cadeia B, 77-89 e 100-103 na cadeia C e, por fim, 81-83 e 102-103 na cadeia D.

Figura 24 - Conteúdo da unidade assimétrica das estruturas cristalográficas obtidas para a SEPT12G. Nas figuras estão ilustradas as unidades assimétricas de cada estrutura cristalográfica. **A)** SEPT12G-GMPPNP1; **B)** SEPT12G-GMPPNP2; **C)** SEPT12G-GDP e **D)** Topologia observada na estrutura SEPT12G-GMPPNP2. As cadeias estão representadas por cores: cadeia A em azul, cadeia B em vermelho, cadeia C em amarelo e cadeia D em verde.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 9 - Dados do processamento e refinamento das estruturas da SEPT12G ligada a ambos os nucleotídeos. Em parênteses estão representados os valores para a camada de mais alta resolução, cuja faixa de resolução é 2,12-2,18 Å para a SEPT12G-GMPPNP1, 1,86-1,91 Å para a SEPT12G-GMPPNP2 e 2,19-2,25 Å para a SEPT12G-GDP.

(Continua)

Coleta de dados	SEPT12G – GMPPNP1	SEPT12G- GMPPNP2	SEPT12G-GDP
Grupo espacial	C222 ₁	P1	P1
Detector	Pilatus3 6M	Pilatus3 6M	Pilatus3 6M
Fonte de Raio X	DLS I24	DLS I24	DLS I24
Comprimento de onda (Å)	0.96861	0.96861	0.96861
Parâmetros da cela unitária			
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	41,02;91,86;151,68	47,50;70,30;89,21	46,96;69,25;88,23
ângulos (°)	90;90;90	74,59;87,91;78,16	75,45;89,46;76,43
Faixa de resolução (Å)	45,93-2,12	60,89-1,86	46,32-2,19
Multiplicidade	5,3 (5,4)	1,9 (2,0)	3,4 (3,5)
<i>R</i> _{meas} (%)*	0,150 (1,151)	0,101 (0,885)	0,128 (0,143)
CC (1/2)	0,994 (0,540)	0,991 (0,572)	0,995 (0,562)
Completeza (%)	99,5 (99,5)	96,4 (95,2)	96,7 (96,3)
Reflexões totais	88807	170413	179493
Reflexões únicas	16639	88175	52030
<i>I</i> /σ (<i>I</i>)	7,9 (1,7)	5,7 (1,4)	6,9 (1,3)
Parâmetros de Refinamento			
Reflexões usadas para o refinamento			
<i>R</i> _{work} (%)**	0,2002	0,1900	0,1919
<i>R</i> _{free} (%)**	0,2464	0,2347	0,2381
Número de átomos de proteína	2291	9467	8696
Número de moléculas de água	107	776	152
<i>B</i> (Å ²)	38,63	20,70	42,92

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 9 - Dados do processamento e refinamento das estruturas da SEPT12G ligada a ambos os nucleotídeos. Em parênteses estão representados os valores para a camada de mais alta resolução, cuja faixa de resolução é 2,12-2,18 Å para a SEPT12G-GMPPNP1, 1,86-1,91 Å para a SEPT12G-GMPPNP2 e 2,19-2,25 Å para a SEPT12G-GDP.

(Conclusão)			
Coleta de dados	SEPT12G – GMPPNP1	SEPT12G – GMPPNP2	SEPT12G- GDP
Gráfico de Ramachandran			
Regiões permitidas (%)	96,98	97,97	97,07
Regiões generosamente permitidas (%)	2,64	2,03	2,73
Regiões não permitidas (%)	0,38	0,00	0,20
All-atom clashcore	1,86	4,31	4,10
RMSD para uma geometria ideal			
r.m.s. comprimentos de ligação (Å)	0,002	0,005	0,002
r.m.s. ângulos de ligação (°)	0,506	0,733	0,614

Fonte: Elaborada pela autora.

Como pode ser observado na Figura 24, todas as estruturas obtidas apresentaram o enovelamento característico das septinas com 8 fitas de folha β , 7 hélices α e algumas voltas que conectam estes elementos de estrutura secundária regular. Nas três primeiras fitas β podemos observar que a β_1 e a β_3 são paralelas entre si, enquanto a β_2 é antiparalela em relação a β_3 . Previamente, uma hipótese foi levantada pelo nosso grupo de pesquisa para a SEPT10 de *Schistosoma mansoni* (SmSEP10), na qual o deslizamento da fita β_3 em função do nucleotídeo ligado (GTP com Mg^{2+} ou GDP), poderia ser uma forma de comunicação entre as interfaces NC e G, Figura 25 [58]. No entanto, as estruturas cristalográficas obtidas neste trabalho não irão contribuir para o entendimento desse mecanismo, uma vez que todas as estruturas, independente do nucleotídeo, estão na conformação “GTP”, ou seja, observada para a estrutura cristalográfica da SmSEPT10G complexada a GTP. Todas as estruturas das septinas do grupo I foram obtidas na presença de Mg^{2+} , o que pode ter impedido o deslizamento observado para a SmSEP10.

Figura 25 - Sobreposição das estruturas de *SmSEPT10G* ligadas a GTP e GDP. O deslocamento da fita parece ser um mecanismo de comunicação entre as interfaces G e NC. A estrutura da *SmSEPT10* ligada a GTP é mostrada na cor azul escuro, enquanto a estrutura *SmSEPT10* ligada a GDP em azul claro. A fita na qual foi observado o deslocamento está destacada em amarelo (complexo com GTP) e em laranja (complexo com GDP).

Fonte: Adaptada de Zeraik et al., 2014.

Os quatro monômeros presentes na unidade assimétrica das estruturas SEPT12G-GMPPNP2 e SEPT12G-GDP foram sobrepostos com o auxílio do programa *Pymol*, resultando em valores de RMS (*Root Mean Square*) baixos, ou seja, as estruturas apresentam uma elevada similaridade estrutural. A sobreposição das cadeias B, C e D sobre a cadeia A da estrutura SEPT12G-GMPPNP2 resultaram em valores de RMS iguais a 0,210; 0,177 e 0,217. A sobreposição das cadeias B, C e D sobre a cadeia A da estrutura SEPT12G-GDP resultaram em valores de RMS iguais a 0,224; 0,219 e 0,199. Em seguida, o alinhamento da cadeia A da estrutura SEPT12G-GMPPNP2 com a cadeia A da estrutura SEPT12G-GDP resultou em um valor de RMS igual a 0,252.

Desta forma, devido à alta similaridade observada as imagens criadas para ilustrar a maior parte da discussão foram baseadas na estrutura SEPT12G-GMPPNP2, uma vez que esta apresentou a maior resolução. A discussão relacionada a estas estruturas também irá apontar diversos resíduos de aminoácidos envolvidas em importantes interações que estabilizam as interfaces G e NC e a ligação da SEPT12 ao nucleotídeo de guanina e ao íon magnésio. De forma a facilitar a visualização destes na estrutura primária o alinhamento mostrado na Figura 26 destaca os resíduos

conservados na família das septinas em ciano, os resíduos existentes apenas na SEPT12 em rosa e aqueles que são variáveis na família em amarelo.

Figura 26 - Alinhamentos das estruturas primárias das septinas que compõem o subgrupo I (SEPT3, SEPT9 e SEPT12). Todos os resíduos discutidos neste trabalho estão representados no alinhamento. Os resíduos destacados em verde referem-se àqueles específicos para o subgrupo I de septinas humanas, em ciano os resíduos que são iguais em todas as septinas humanas, em amarelo os que variam e em rosa os resíduos específicos para a SEPT12. As regiões características estão destacadas pelos quadrados e a numeração foi baseada na SEPT12.

Fonte: Elaborada pela autora.

As duas regiões que apresentam conformações variáveis são regiões flexíveis, como o *switch* I, uma região altamente variável em pequenas GTPases e na qual nenhuma das cadeias está completa, e um *loop* variável entre as hélices $\alpha 2$ e fita $\beta 4$, conforme observado nas Figuras 27A e 27B, respectivamente.

Figura 27 - Sobreposição dos quarto monômeros obtidos na unidade assimétrica das estruturas SEPT12G-GDP (A) e SEPT12G-GMPPNP2 (B).

Fonte: Elaborada pela autora.

Conforme citado anteriormente, as GTPases, incluindo a família das septinas apresentam regiões características dentro do domínio de ligação ao nucleotídeo. Elas são responsáveis pela capacidade de ligar e hidrolisar o GTP. Nas estruturas cristalográficas obtidas, foi possível localizar as interações realizadas por resíduos específicos desses domínios com o nucleotídeo e o íon Mg^{2+} , conforme observado na Figura 28. As regiões referentes ao domínio *P-loop* (consenso GxxGxGKST), o motivo *switch* I, o motivo G3 ou *switch* II (consenso DxxG) e o motivo G4 (consenso xKxD) estão representadas na Figura 28.

No domínio *P-loop* foram observadas as interações clássicas que estabilizam o nucleotídeo e o íon Mg^{2+} . O resíduo Lys62 interage com os fosfatos β e γ do nucleotídeo, a Ser63 com o íon Mg^{2+} e a Thr64 forma ligação de hidrogênio com o fosfato α do nucleotídeo, conforme ilustrado na Figura 28. O segundo motivo é o motivo *switch* I, caracterizado pela presença da treonina catalítica (Thr89) que coordena o íon Mg^{2+} , destacada na Figura 28, onde ocorre a mutação

estudada neste trabalho (SEPT12G^{T89M}). Essa região não está completa em nenhuma das estruturas obtidas, demonstrando assim que se trata de uma região flexível.

Em seguida, temos o motivo G3 ou *switch* II, caracterizado pelo consenso DxxG. O resíduo Gly115 interage com o fosfato γ do GTP. Todos os resíduos citados são conservados dentro dos subgrupos de septinas. O mecanismo de hidrólise, chamado de *switch* universal, é baseado na presença dos resíduos Thr89 e Gly115. A amida da cadeia principal de cada um desses resíduos forma uma ligação de hidrogênio com o fosfato γ , estabilizando o complexo com GTP [44].

Figura 28 - Motivos característicos das pequenas GTPases, incluindo septinas. O *P-loop* está representado em vermelho, o *switch* I em azul, o motivo G3 ou *switch* II em violeta e, por fim, o motivo G4 em ciano. Em destaque alguns dos aminoácidos importantes para a ligação e hidrólise do nucleotídeo.

Fonte: Elaborada pela autora.

O motivo G4 ilustrado na Figura 28 é bastante conservado nas septinas humanas, sendo que apenas a SEPT12 apresenta uma mudança no consenso que o caracteriza. Na SEPT12 a sequência é xRx_D em vez de xKx_D. Este motivo tem sido relacionado à especificidade da ligação do GTP, uma vez que há a formação de ligações de hidrogênio entre o resíduo de ácido aspártico com a base guanina [73,74].

Comparando-se a estrutura obtida com a estrutura da proteína SEPT9, pôde-se observar que a substituição da lisina por uma arginina na SEPT12 não interrompe nenhuma das interações previamente observadas, Figura 29A. Na SEPT12 a Arg195 interage com os resíduos Gly 59 do

P-loop da mesma cadeia, além da Pro167 e Ser198 da cadeia vizinha através da interface G. Para a SEPT9, proteína homóloga que apresenta a Lys característica do motivo G4, podemos observar que a Lys170 interage com a Gly33 e Ala142 (resíduo correspondente à Pro167 em SEPT12), Figura 29B.

Uma segunda arginina, Arg266, faz uma interação de empilhamento com a base guanina, mas do outro lado em relação à Arg195. As interações feitas por esta segunda arginina, incluindo com Glu203 da subunidade vizinha são mantidas em SEPT12, conforme observado em SEPT9 e SEPT3 [57,72].

Figura 29 - Interações estabelecidas pelos resíduos de aminoácidos que compõem o motivo G4. A) proteína SEPT12; B) proteína SEPT9. O resíduo da região G4 está destacado na forma de *stick* em vermelho, sendo que este resíduo é uma Arg195 para a SEPT12 e Lys170 para a SEPT9. A segunda arginina envolvida na interação de empilhamento está representada na forma de *stick* em azul (Arg266 na SEPT12 e Arg241 na SEPT9). Os resíduos que interagem com os resíduos Arg e Lys estão destacado em *sticks* na cor amarela, sendo uma Ser198 e Gly59 para a SEPT12 e uma Ala142 e Gly33 para a SEPT9.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.7.1 Estudos da interface G

A interface G está presente na unidade assimétrica para as estruturas cristalográficas SEPT12G-GMPPNP2 e SEPT12G-GDP, sendo o contato entre dois dos quatro monômeros. Uma segunda interface G, cristalograficamente independente, pode ser gerada por simetria cristalográfica. No caso da estrutura SEPT12G-GMPPNP1, que tem apenas um monômero na

unidade assimétrica, a interface G também é gerada por simetria cristalográfica. Embora presente em todas as estruturas, esta interface é considerada promíscua, uma vez que em um heterofilamento de ocorrência biológica, esta interface é formada pela interação com a proteína SEPT7, Figura 30.

Figura 30 - Esquema de polimerização de um filamento de septinas baseado em octâmeros. Cada posição é ocupada por um representante de cada grupo de septina (mostrado em cores). Destacando a alternância entre as interfaces G e NC.

Fonte: Elaborada pela autora.

No contexto do estudo da interface G, Figura 31A, observou-se que o *switch I* não se aproxima da outra subunidade fazendo com que nenhuma interação intersubunidade importante seja realizada pelo *switch I*. No entanto, vale lembrar que esta interface é promíscua e, assim, na presença do parceiro de interação correto (SEPT7) nós ainda não podemos afirmar se esta região será importante para estabilizar ou não o heterodímero.

O motivo G4 descrito acima contribui para a estabilização da interface G. A alteração observada para a SEPT12 faz com que esta consiga estabelecer um maior número de ligações em comparação com a SEPT9. Para a SEPT12 a Arg195 interage com a Ser198 e com a Pro167, da outra subunidade, e com a Gly59 e Ser198 da mesma subunidade, sendo a última interação feita apenas pelas cadeias principais dos resíduos envolvidos. Portanto, Ser198, um resíduo encontrado apenas na SEPT12 forma duas ligações de hidrogênio com os resíduos de Arg195 das duas subunidades, Figura 31B. Essas interações poderiam auxiliar na estabilidade da interface G. A Lys170 da SEPT9 (resíduo homólogo a Arg195), por sua vez, interage com a Thr173 da outra subunidade e com a Thr173 e Gly33 da mesma subunidade, Figura 31C.

Figura 31 – Resíduos que estabelecem importantes interações para a manutenção da interface G no homodímero da SEPT12G. (A) Estrutura cristalográfica da interface G do homodímero; Destaque para os resíduos importantes no homodímero da SEPT12G **(B)** e da SEPT9G **(C)**. A cadeia D está destacada em verde escuro e a cadeia A em verde claro. Os resíduos destacados na forma de *sticks* são a Arg195 da SEPT12 e a Lys170 da SEPT9 em vermelho e os resíduos que interagem com eles: Pro167, Gly59 e Ser198 na SEPT12 e Thr173 e Gly33 na SEPT9.

A)

B)

C)

Fonte: Elaborada pela autora.

A Ser198 é um resíduo específico da SEPT12, sendo encontrado em ambas as variantes da SEPT12, mas em nenhuma outra septina humana. Também é encontrado em SEPT12 de outros mamíferos, como o *M. musculus*, *R. norvegicus* e *B. taurus*. Recentemente, Kuo et. al. reportaram que a fosforilação deste resíduo pela PKA faz com que a SEPT12 se dissocie dos complexos, que perdem a capacidade de se polimerizarem e formarem filamentos e, assim, o *annulus* do espermatozoide não é formado [46]. Os autores reportaram que a Ser198 estaria localizada no meio da interface G através da construção de um modelo molecular. Com a obtenção da estrutura cristalográfica da SEPT12G pôde ser observado a importância deste resíduo para a interface G. Em nossa estrutura, como foi descrito acima, a Ser198 estabelece importantes interações com os elementos do domínio G4 e sua posição na região central da interface G faz com que a acomodação

desse resíduo fosforilado seja dificultado, podendo gerar impedimentos estéricos capazes de desestabilizar a interface G, conforme ilustrado na Figura 32. Não foram encontrados estudos que reportam a fosforilação da Thr173 como possível mecanismo para a interrupção da formação da interface G.

Figura 32 - Localização da serina fosforilada na interface G do homodímero da SEPT12G. A estrutura cristalográfica da SEPT12G-GMPPNP2 está representada em *ribbons*, enquanto que o resíduo Ser198 e o nucleotídeos foram destacados na forma de *sticks*. Para representar o volume que a Ser198 fosforilada ocuparia nesta posição, esta foi representada também na forma de esferas transparentes.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os sítios de ligação ao nucleotídeo de todos os monômeros apresentam as interações características descritas anteriormente. Na Figura 33A, podemos observar que os resíduos Arg195, Gly251, Asp197, Thr89 e Pro114, descritos anteriormente, além de outros resíduos capazes de estabelecerem interações com o nucleotídeo estão presentes na análise realizada pela ferramenta de bioinformática PDBsum (EMBL-EBI). A treonina catalítica, responsável pela hidrólise do nucleotídeo, apresenta a coordenação característica para septinas. No complexo com GMPPNP, ela coordena o íon magnésio juntamente com o fosfato β e γ do nucleotídeo, Ser63, Asp112 (via uma molécula de água) e uma molécula de H_2O , Figura 33B. No caso de SEPT12G-GDP, na maioria dos monômeros da unidade assimétrica a coordenação é mantida, com exceção do fosfato γ que é substituído por uma molécula de água. Porém, na subunidade D a Thr89 não coordena o Mg^{2+} , devido a uma alteração no percurso do *switch* I e, assim, é substituído por mais uma água.

Figura 33 - Interações responsáveis pela estabilização do nucleotídeo de guanina e do íon Mg^{2+} . A) Resíduos que interagem com o nucleotídeo B) Resíduos que coordenam o íon Mg^{2+} . As imagens foram obtidas com base na estrutura SEPT12G-GMPPNP2. As distâncias entre os resíduos estão representadas.

A)

B)

Fonte: PDBsum.

5.1.7.2 Estudos da interface NC

A obtenção das interfaces NC foi possível, para as estruturas SEPT12G-GMPPNP2 e SEPT12G-GDP, devido à utilização de operações de translação da unidade assimétrica. Esta interface é particularmente importante para o grupo I das septinas humanas, uma vez que estas foram reportadas ocupando a posição terminal nos heterocomplexos e, assim, a sua associação permite a polimerização dos oligômeros em filamentos. Estudos comparativos realizados com as proteínas SEPT2, SEPT7, SEPT3 e SEPT9 permitiram observar diferentes conformações para as interfaces NC.

Para o subgrupo I (SEPT3, SEPT9 e SEPT12) as interfaces NC podem ocorrer em três conformações. A primeira estrutura obtida para este subgrupo foi a da proteína SEPT3. Nesta estrutura a interface NC é do tipo fechada, na qual as hélices $\alpha 6$ estão mais próximas e as hélices $\alpha 2$ estão mais afastadas, independente do nucleotídeo ligado. No entanto, com a determinação da estrutura da SEPT9 observou-se que as duas interfaces podiam ocorrer para a mesma proteína, sendo que no complexo com GDP a interface está na conformação aberta enquanto para o GTP γ S esta é encontrada fechada. A estrutura da SEPT9 ligada a GTP γ S foi obtida por *soaking*, neste método um cristal da SEPT9 ligada a GDP foi incubado em uma solução concentrada de GTP γ S. Este resultado sugere uma possível dependência da conformação na interface NC em relação ao nucleotídeo ligado, conforme observado na Figura 34. Em todas as estruturas resolvidas para as integrantes dos demais subgrupos de septinas, incluindo SEPT2, SEPT7 e *Sm*SEPT10 (SEPT10 de *S. mansoni*) a interface NC sempre foi observada na conformação aberta.

Portanto, as estruturas resolvidas para as proteínas SEPT3 e SEPT9 sugerem que a interface NC entre duas cópias de septinas do subgrupo I tem um comportamento diferenciado em relação às demais e a capacidade de alterar as interações na interface NC talvez seja relacionada à polimerização dos heterocomplexos em filamentos, uma vez que esta interface ocupa a posição terminal no heterocomplexo octamérico. Alternativamente, como sugerido pelas estruturas da SEPT9, o fechamento da interface pode estar relacionado com a hidrólise de GTP. O fechamento da interface pode resultar na liberação da hélice $\alpha 0$ que, na conformação aberta, se encontra ancorada dentro da interface. Uma vez que $\alpha 0$ corresponde a região polibásica, sabidamente envolvida na interação com membranas, o movimento das subunidades das septinas do grupo I em torno da interface NC pode estar relacionada com a ligação e interação dos heterofilamentos com membranas.

Figura 34 - Interfaces NC observadas para a estrutura cristalográfica da SEPT12G-GMPPNP2. A)

Interface fechada e assimétrica na estrutura SEPT12G-GMPPNP; **B)** interface fechada na estrutura SEPT9-GTP γ S e **C)** interface aberta na estrutura SEPT12G-GMPPNP. As interfaces estão representadas na forma de cartoons, sendo que a estrutura de baixo encontra-se rotacionada por 90° em relação ao de cima. Em A estão indicadas as posições das hélices $\alpha 2$ e $\alpha 6$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Surpreendentemente, foram encontradas as duas interfaces ao longo do filamento observado para a SEPT12 ligada tanto a GDP quanto a GMPPNP, Figura 35A. Os filamentos apresentam três diferenças em relação aos demais membros de seu grupo. Primeiramente,

apresentam interfaces NC dos tipos aberta e fechada no mesmo filamento; segundo, o filamento apresenta um desvio na linearidade e, terceiro, as hélices $\alpha 6$ estão deslocadas por, aproximadamente, 7,6 Å paralelo aos seus eixos, fazendo com que a interface fechada seja assimétrica.

A unidade assimétrica possui quatro monômeros, sendo que dois se associam formando uma interface G. Ao utilizarmos operações de translação da unidade assimétrica, observamos a uma nova interface G e duas interfaces NC que têm como característica em comum serem cristalograficamente independentes. Assim, a formação de duas interfaces NC diferentes dentro do mesmo filamento só é possível uma vez que existem quatro monômeros na unidade assimétrica e, devido ao empacotamento cristalino, estes podem formar interfaces cristalograficamente independentes, ou seja, que não precisam ser iguais em orientação.

As interfaces observadas para as proteínas membro do subgrupo I estão representadas na Figura 35. A perda de linearidade do filamento é consequência da interface NC assimétrica que faz com que apenas a metade das interfaces NC apresentem eixos de simetria de ordem 2 perpendiculares ao eixo principal do filamento. Em um filamento convencional (SEPT9- GTP γ S por exemplo) todas as interfaces NC apresentam simetria de ordem 2.

Figura 35 - Filamentos observados em septinas do subgrupo I. A) Estrutura da SEPT12G-GMPPNP, que apresenta interfaces NC nas conformações aberta e fechada dentro do mesmo filamento; B) Estrutura da SEPT9-GTP γ S, que apresenta todas as interfaces NC na conformação fechada.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nestas estruturas, tanto SEPT12G-GMPPNP2 quanto SEPT12G-GDP, as cadeias B e D formam a interface NC aberta e simétrica, enquanto as cadeias A e C formam a interface NC fechada e assimétrica. A interface aberta apresenta um padrão clássico de pontes salinas como já visto nas estruturas de SEPT2, SEPT7 e *Sm*SEPT10. Os resíduos envolvidos na formação desta interface são: Arg311 e Glu308 da hélice $\alpha 6$, Glu144 da hélice $\alpha 2$, Arg149 e moléculas de água que foram omitidas para facilitar a visualização dos resíduos, conforme observado na Figura 36A. Essas interações estão ausentes na interface fechada, Figura 36B.

Figura 36 - Interações observadas na interface NC. A) Pontes salinas formadas pelos resíduos que auxiliam na estabilização da interface aberta; B) Pontes salinas que estabilizam a interface fechada. Os resíduos de aminoácidos em destaques estão representados em *sticks* na coloração vermelha para os resíduos ácidos e em azul para os resíduos básicos.

Fonte: Elaborada pela autora.

O fechamento da interface desfaz pontes salinas que estabilizam a interface aberta e, assim, é necessário que interações mais favoráveis sejam obtidas para que este fenômeno seja observado. A interface NC fechada apresenta duas regiões estruturalmente diferentes devido à sua assimetria. Uma dessas regiões é capaz de estabelecer mais interações do que a outra, o que pode contribuir para a estabilização do deslocamento das subunidades, uma vez que não seria possível formar simultaneamente interações favoráveis dos dois lados da interface sem que haja o deslocamento. Nesta conformação novas interações são observadas. A Arg149, localizada na subunidade “baixa”,

representada na Figura 36A, altera a sua orientação e passa a interagir com os resíduos Asp297 e Asp234 da subunidade “alta”, representada na Figura 36A. Além deste resíduo, a His152 da subunidade baixa também interage com a Asp234 da subunidade “alta”. A Gln150, presente na subunidade baixa, é capaz de estabelecer interações intra e intercadeia com os resíduos Tyr140 e Asp300, respectivamente. Essas interações estão representadas na Figura 37. Desta forma, podemos observar uma tendência da Arg149 de se aproximar dos resíduos da região polibásica, entre os resíduos 229 e 234 (sequência DEDIND em SEPT12). Embora todos os grupos de septinas nesta região apresentem uma sequência rica em resíduos ácidos, os detalhes diferem de um subgrupo para outro. Particularmente interessante é a posição 234 que é ocupada por um resíduo ácido apenas do subgrupo I, ao qual a SEPT12 pertence. Ao interagir com Arg149 e His152, a Asp234 parece ter um papel fundamental em facilitar a formação da interface fechada, possivelmente explicando porque esta conformação foi vista apenas neste subgrupo. O resíduo Asp234 pertence à hélice $\alpha 5'$ que será descrita mais adiante.

Figura 37 - Resíduos de aminoácidos envolvidas nas interações que estabilizam a interface NC fechada da SEPT12G. Os resíduos destacados na forma de *sticks* estão representam os resíduos ácidos em vermelho, resíduos básicos em azul e resíduos neutros em amarelo. Os elementos de estrutura secundária envolvidos na formação das interfaces (hélices $\alpha 2$ e $\alpha 6$ das subunidades “baixa” e “alta”) também estão destacados.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os três tipos de interfaces observadas para as proteínas membros do subgrupo I foram chamadas de aberta, fechada e fechada assimétrica. Estes resultados levaram a três possíveis explicações. Na primeira possibilidade, as três proteínas seriam intrinsecamente diferentes. Isto é, a SEPT3 possui uma interface NC sempre fechada, na SEPT9 a interface é sensível ao nucleotídeo ligado e a SEPT12 apresenta uma interface NC única (fechada e assimétrica), observada apenas na sua estrutura. Na segunda possibilidade, algumas das interfaces observadas nas estruturas cristalográficas não representam a situação fisiológica por serem sujeitas aos efeitos de empacotamento cristalino. É interessante notar que as estruturas cristalográficas da SEPT9-GTP γ S foram obtidas pelo método de *soaking*, no qual cristais do complexo com GDP foram incubados com excesso de GTP γ S. Neste caso o empacotamento cristalino é mais maleável permitindo que a interface NC respondesse ao tipo de nucleotídeo. Uma vez que os elementos fundamentais para a interface NC estão presentes em todas as proteínas do subgrupo I, acredita-se que a plasticidade da interface é uma característica intrínseca deste subgrupo permitindo o filamento responder à hidrólise de GTP. Desta forma, o fato dos resultados obtidos para a SEPT9 não terem se repetido para SEPT3 e SEPT12 pode ser o resultado de forças de empacotamento cristalino.

O fechamento da interface desfaz pontes salinas que estabilizam a interface aberta e, assim, é necessário que interações mais favoráveis sejam obtidas para que este fenômeno seja observado. Um fator estrutural que caracteriza este subgrupo é a orientação diferencial da hélice $\alpha 5'$. A partir do resíduo Pro224, na configuração *cis*, localizado no *loop* que antecede a hélice $\alpha 5'$, a cadeia principal realiza um caminho diferente, quando comparada à estrutura de septinas de outros grupos, que permite a formação da hélice $\alpha 5'$ paralela à hélice $\alpha 2$. Nesta posição, os resíduos Phe228 e Ile305 interagem estabilizando a nova orientação. Esta mudança faz a Arg149 ser capaz de interagir com a região poliácida existente nesse subgrupo, mais especificamente com o resíduo Asp234 criando uma interação fundamental para o fechamento da interface, Figura 38. Uma hipótese levantada após a obtenção da estrutura cristalográfica da SEPT9 é que com o fechamento da interface NC, a hélice $\alpha 5'$, que possui uma orientação diferencial neste subgrupo, pode ficar mais exposta e interagir com membranas [72].

Figura 38 - Esquema representativo das interações que favorecem a orientação diferencial da hélice $\alpha 5'$. Nas septinas do subgrupo I pode-se observar que após o resíduo Pro224, o caminho da cadeia polipeptídica se altera e, assim a hélice $\alpha 5'$ forma-se em uma orientação diferente da observada para as septinas de outros subgrupos, representada pela linha pontilhada. Nesta orientação, os resíduos Phe228 e Ile305 podem interagir e o resíduo Asp234 está disponível para estabelecer interações com a Arg149.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.6.2 Variante 1 da SEPT12G humana

O alinhamento entre as estruturas primárias das variantes reportadas para a SEPT12 permitiram observar que a principal diferença encontra-se na ausência de 41 resíduos de aminoácidos na região central da variante 1, Figura 39A. Embora esses resíduos de aminoácidos não correspondam aos consensos que definem as regiões características das pequenas GTPases, discutidas anteriormente, a perda desses resíduos afetaria a organização da hélice $\alpha 2$ e da folha β_4 , Figura 39B. A hélice $\alpha 2$ é importante para estabelecer interações existentes na interface NC fisiológica e, assim, a perda deste elemento de estrutura secundária poderia desestabilizar a formação dos filamentos de septinas e, assim, contribuir para a perda da função relacionada a estas.

Figura 39 - Representação dos elementos de estrutura secundária afetados pela ausência de 41 resíduos de aminoácidos na região central da variante 1. A) Alinhamento das estruturas primárias das variantes 1 e 2 com auxílio da ferramenta de bioinformática Clustal. Destacando-se as regiões que codificam os elementos de estrutura secundária hélice $\alpha 2$ e folha $\beta 4$. **B)** Estrutura cristalográfica da SEPT12G-GMPPNP2 com destaque em azul para as regiões que não existiriam na variante 1.

A)

	Hélice $\alpha 2$	Folha $\beta 4$
v2	DNCWDPILGYINEQYEQYLQEEIL	ITRQRHIPDTRVHCCVYFVPPTGHCLRPDLI
v1	DNC-----	-----LRPLDI

B)

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.6.3 Resíduos característicos do subgrupo I das septinas humanas

Devido a capacidade que as septinas possuem de substituir outra do mesmo subgrupo, segundo a regra de Kinoshita [30], é interessante investigar os papéis estruturais dos resíduos conservados dentro de um subgrupo, mas diferentes nos demais. Definimos tais resíduos como característicos do subgrupo. Neste trabalho, investigamos o caso do subgrupo I especificamente por incluir a proteína estudada SEPT12. Os resíduos característicos, também chamados de resíduos verdes, estão ilustrados em verde na Figura 26 e listados na Tabela 10. Muitos dos resíduos característico do subgrupo I se concentram na superfície da estrutura e, desta forma, podem ser importantes para a interação com proteínas parceiras. No entanto, outros podem ter um papel estrutural importante para o subgrupo I. A distribuição dos resíduos na estrutura cristalográfica da SEPT12 está ilustrada na Figura 40.

Tabela 10 - Resíduos característicos das proteínas do grupo I. Os resíduos destacados com asteriscos encontram-se representados na Figura 26.

Resíduos característicos
Gln57
Lys71
Ser72
Pro87
His97
Asn134
Tyr137
Pro224*
Gln225
Phe228*
Asp234*
Arg242
Asp253
Leu264
Lys267
Thr268
Ile273
Glu282
Ile305*
Asn316

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 40 - Distribuição dos resíduos característicos da SEPT12 na estrutura cristalográfica SEPT12G-GMPPNP2.

Fonte: Elaborada pela autora.

Estudos comparativos realizados anteriormente utilizando-se as estruturas da SEPT3 complexadas a GTP (código PDB: 4Z51) e GDP (código PDB: 4Z54), a primeira representante do grupo I resolvida pelo nosso grupo de pesquisa, com a SEPT2 complexada a GDP (código PDB: 2QNR), disponível na literatura, demonstraram que a hélice $\alpha 5'$ apresentava uma orientação diferente. Esta informação foi reforçada com a obtenção da estrutura cristalográfica da SEPT9 (código PDB: 5CYO) complexada a ambos os nucleotídeos. Desta forma, para determinar se a orientação diferencial, que ainda não havia sido observada para nenhuma das outras estruturas cristalográficas de septinas dos demais subgrupos, era uma característica do grupo I faltava apenas a obtenção de informações estruturais sobre a SEPT12. Alinhando-se a estrutura cristalográfica destas proteínas, ilustrado na Figura 41, foi observado que a SEPT12 apresenta a mesma orientação encontrada para as proteínas membros de seu subgrupo (SEPT3 e SEPT9) comparada com a SEPT2 do subgrupo III.

Figura 41 - Alinhamento das estruturas cristalográficas das proteínas SEPT2-GTP, SEPT3-GMPPNP, SEPT9-GTP γ S e SEPT12-GMPPNP. As estruturas cristalográficas estão representadas nas colorações: verde claro para a SEPT3-GMPPNP (código PDB: 4Z51), verde escuro para a SEPT9-GTP γ S (código PDB: 5CYP), ciano para a SEPT12-GMPPNP e amarelo para a SEPT2-GDP (código PDB: 2QNR).

Fonte: Elaborada pela autora.

O resíduo Pro224, destacado na Figura 42A, é na maioria das septinas uma histidina (His). Este resíduo encontra-se na configuração *cis*, uma conformação menos comum que a *trans*, em todas as estruturas do subgrupo I. As prolinas *cis*, quando presentes em proteínas, são frequentemente associadas a algum papel funcional. Como podemos observar na Figura 42A, a partir deste resíduo a cadeia principal das proteínas do subgrupo I toma um caminho totalmente diferente daquele observado para a SEPT2 e as proteínas dos demais subgrupos. Pode-se observar também que as estruturas do subgrupo I formam uma hélice α logo após a prolina que não é vista nas demais estruturas. Assim, as observações indicam que a Pro224, que se encontra alguns resíduos antes do início da hélice $\alpha 5'$, esteja relacionada com a sua reorientação.

A reorientação da hélice $\alpha 5'$ foi observada para todas as septinas que compõem o subgrupo I e está relacionada com a presença dos resíduos conservados neste subgrupo, resíduos característicos, Pro224, Phe228 e Ile305 (Tabela 10). A Phe228, imediatamente antes da região poliácida, e Ile305, da hélice $\alpha 6$, formam um contato hidrofóbico importante para levantar a $\alpha 5'$, aproximando-a da hélice $\alpha 6$ e posicionando a região polibásica de forma que esta é capaz de interagir com a Arg149 da subunidade vizinha na conformação fechada, Figura 42B. Concluimos,

assim, que a orientação diferenciada da hélice $\alpha 5'$ no subgrupo I, determinado pela presença de resíduos característicos, altera a interface NC ao ponto de permitir que essa interface seja flexível para assumir as conformações aberta e fechada.

Figura 42 - Mudança no caminho da cadeia principal a partir do resíduo de Pro224. A) Localização dos resíduos Pro224 em SEPT12 e His212 em SEPT2; B) Localização dos resíduos Ile305 e Pro228 que passam a interagir após a re-orientação da hélice $\alpha 5'$. Em ciano está representada a estrutura das proteínas da SEPT12, representando o subgrupo I, e em amarelo a estrutura da SEPT2.

Fonte: Elaborada pela autora.

Assim, uma constelação de resíduos encontrados apenas no subgrupo I das septinas humanas (Pro224, Phe228 e Ile305), reorienta a hélice $\alpha 5'$ gerando uma topografia diferenciada na interface NC, permitindo vários modos de contato entre as subunidades (aberto, fechado e fechado assimétrico). É interessante notar que esta flexibilidade encontrada apenas no subgrupo I pode também estar relacionada com a falta de uma região *coiled-coil* no seu domínio C-terminal que poderia restringir a flexibilidade.

5.2 Domínio de ligação ao nucleotídeo do mutante de SEPT12G

5.2.1 Obtenção do mutante SEPT12G^{T89M}

O mutante SEPT12^{T89M} consiste na substituição de um resíduo de treonina por uma metionina na posição 89 do *switch* I. Esta treonina participa da coordenação do íon magnésio além de segurar a água catalítica sendo, assim, considerada importante para a hidrólise do nucleotídeo. Uma evidência de sua importância é a de que o subgrupo II das proteínas humanas não a possuem e não apresentam atividade catalítica, estando sempre complexadas ao nucleotídeo GTP. O domínio de ligação ao nucleotídeo do mutante SEPT12^{T89M} foi obtido por meio da técnica de mutagênese sítio dirigida e a sua integridade foi comprovada pelo sequenciamento.

O método utilizado para a expressão do mutante foi apropriado para a expressão desta proteína e após a primeira etapa de purificação, cromatografia de afinidade, o rendimento obtido para a amostra foi de 0,8 mg/mL. No entanto, uma vez que não foi possível concentrar as amostras obtidas da proteína, uma purificação adicional iria diminuir a concentração e dificultar o trabalho. Sendo assim optou-se por realizar ensaios de cristalização após a etapa de purificação por cromatografia de afinidade, Figura 43.

Figura 43 - Padrão de expressão e purificação da SEPT12G^{T89M}. No gel de agarose estão representadas as amostras: M) marcador de baixo peso molecular; 1) proteínas totais de *E. coli* antes da indução; 2) fração solúvel após lise; 3) fração insolúvel após lise; 4) não ligado; 5) lavagem 1; 6) lavagem 2 e 7-8) alíquotas da eluição.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.2 Estrutura Cristalográfica SEPT12G^{T89M}

Os ensaios de cristalização resultaram em cristais para a condição E11 do kit de cristalização *Morpheus*, Tabela 11. Os cristais foram difratados e um conjunto de dados com resolução de 2,17 Å foi obtido, permitindo a resolução da estrutura cristalográfica.

Tabela 11 - Condição de cristalização do kit Morpheus em que foram obtidos cristais da SEPT12G^{T89M}.

Estrutura	Poço	Mix de precipitantes	Mix de aditivos	Sistema tampão
SEPT12 ^{T89M}	E11	10 % PEG 4000	0,03 M de cada	0,1 M de <i>bicine/Trizma</i>
GDP		20 % glicerol	etileno glicol*	<i>base</i> pH 8,5

* a composição de cada *mix* pode ser encontrada no manual do fabricante.

Fonte: Elaborada pela autora.

A estrutura cristalográfica da SEPT12G^{T89M} complexada ao nucleotídeo GDP pertence ao grupo espacial C121 do sistema monoclinico. Esta estrutura foi refinada até valores de R_{work} e R_{free} de 0,20 e 0,24, respectivamente (Tabela 12). A estrutura apresenta um monômero na unidade assimétrica, com as mesmas características observadas para as estruturas da SEPT12G, Figura 44. As regiões nas quais há falhas na densidade eletrônica ocorrem entre resíduos 80-87 e 100-104.

Figura 44 - Conteúdo da unidade assimétrica da estrutura cristalográfica SEPT12G^{T89M}-GDP.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 12 - Dados do processamento e refinamento das estruturas da SEPT12G^{T89M} ligada a GDP.

Em parênteses estão representados os valores para a camada de mais alta resolução, cuja faixa de resolução é 2,17-2,23 Å para a SEPT12G^{T89M}-GDP.

(Continua)

Coleta de dados	SEPT12G ^{T89M} -GDP
Grupo espacial	C121
Detector	Pilatus3 6M
Fonte de Raio X	DLS I24
Comprimento de onda (Å)	0.96861
Parâmetros da cela unitária	
<i>a, b, c</i> (Å)	83,92;56,49;70,29
ângulos (°)	90;114,86;90
Faixa de resolução (Å)	29,84-2,17
Multiplicidade	6,5 (6,7)
<i>R</i> _{meas} (%)*	0,152 (1,261)
CC (1/2)	0,995 (0,528)
Completeza (%)	99,6 (99,6)
Reflexões totais	103388
Reflexões únicas	15878
<i>I</i> /σ (<i>I</i>)	8,7 (1,7)
Parâmetros de Refinamento	
Reflexões usadas para o refinamento	
<i>R</i> _{work} (%)**	0,1988
<i>R</i> _{free} (%)**	0,2466
Número de átomos de proteína	2157
Número de moléculas de água	50
<i>B</i> (Å ²)	42,98

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 12 - Dados do processamento e refinamento das estruturas da SEPT12G^{T89M} ligada a GDP.
Em parênteses estão representados os valores para a camada de mais alta resolução, cuja faixa de resolução é 2,17-2,23 Å para a SEPT12G^{T89M}-GDP.

(Conclusão)

Coleta de dados	SEPT12G – GMPPNP1
Gráfico de Ramachandran	
Regiões permitidas (%)	96,43
Regiões generosamente permitidas (%)	3,57
Regiões não permitidas (%)	0,00
All-atom clashcore	5,05
RMSD para uma geometria ideal	
r.m.s. comprimentos de ligação (Å)	0,005
r.m.s. ângulos de ligação (°)	0,792

Fonte: Elaborada pela autora.

Nesta estrutura, o sítio de ligação ao nucleotídeo apresenta uma diferença em relação às estruturas mostradas anteriormente. O resíduo Met89 é incapaz de coordenar o íon Mg^{2+} que passa a interagir com uma molécula de água. Portanto, a coordenação do íon Mg^{2+} é feita pelo fosfato β , Ser63, Asp112 (via molécula de água) e três H_2O , como visto na cadeia D da SEPT12-GDP. Esta observação pode explicar o motivo da perda de atividade para a SEPT12^{T89M}, uma vez que o mecanismo do *switch* universal, que auxilia no deslocamento do fosfato γ da estrutura, é impedido. Na Figura 45 encontra-se a densidade eletrônica para o sítio de ligação ao nucleotídeo.

Figura 45 - Sítio de ligação ao nucleotídeo da SEPT12G^{T89M}-GDP. O íon Mg^{2+} em verde é coordenado pelos resíduos Met89, Asp112 (por meio de uma água), Ser63 e fosfato β .

Fonte: Elaborada pela autora.

As interfaces do tipo G e NC também foram observadas para esta estrutura, conforme observado na Figura 46. No entanto, os filamentos obtidos possuem a conformação clássica das interfaces NC abertas, cujas interações que a estabiliza já são bem consolidadas e foram discutidas anteriormente.

Figura 46 - Interface NC da estrutura cristalográfica da SEPT12G^{T89M}-GDP. As interfaces estão representadas na forma de cartoons, sendo que a estrutura de baixo encontra-se rotacionada por 90° em relação ao de cima.

Fonte: Elaborada pela autora.

A interface NC observada para as proteínas do subgrupo I apresentaram diferentes conformações. Para a SEPT3-GMPPNPP e SEPT3-GDP foi observada a interface fechada, enquanto que a SEPT9-GTP apresentou a interface fechada e SEPT9-GDP a interface aberta. No entanto, nas estruturas cristalográficas da SEPT12-GMPPNP e SEPT12-GDP foram observadas a interface NC aberta e uma interface NC fechada e assimétrica dentro do mesmo filamento, sendo que a última foi encontrada apenas em SEPT12. As observações permitiram obter três possíveis explicações: a primeira é de que as interfaces NC são diferentes para cada septina do subgrupo I, a segunda a de que se trata de um artefato do empacotamento cristalino e a terceira de que independente do resultado já obtido, as interfaces NC que ocorrem nesse subgrupo possuem plasticidade. Os resultados obtidos para a SEPT9 reforçam a última possibilidade para esta proteína, uma vez que os cristais foram obtidos por *soaking* e, assim, a interface seria dependente do nucleotídeo ligado.

5.3 Heterodímero SEPT7NGc-SEPT12G

5.3.1 Clonagem, coexpressão e purificação do heterodímero

As sequências codificantes das proteínas SEPT7NGc e SEPT12G foram subclonadas no vetor de expressão bicistrônico pETDuet-1, que possui dois sítios de múltipla clonagem. A SEPT7NGc foi inserida no primeiro sítio, de forma que fosse expressa fusionada à His-tag. Após a confirmação da clonagem por meio da análise de restrição, Figura 47, experimentos de expressão foram realizados e resultaram na obtenção de ambas as proteínas na fração solúvel. A banda referente ao plasmídeo pETDuet-1 SEPT7NGc tem tamanho de, aproximadamente, 6503 pb, enquanto a banda referente à SEPT12G está localizada em, aproximadamente, 822 pb.

Figura 47 - Análise de restrição. Subclonagem da SEPT12G no plasmídeo pETDuet-1 SEPT7NGc. No gel está representado: **M)** marcador 1 kb DNA Ladder (Promega), **1)** produtos da digestão.

Fonte: Elaborada pela autora.

Utilizando-se a cromatografia de afinidade foi possível determinar se as proteínas interagem, uma vez que como apenas a proteína SEPT7NGc estava fusionada à His-tag, a purificação da SEPT12G só seria possível se elas interagissem. Primeiramente, realizou-se a purificação utilizando-se um tampão com 500 mM de NaCl e, como podemos observar na Figura 48A, embora houvesse a expressão de ambas as proteínas, a SEPT7NGc era obtida com excesso em relação à SEPT12G. Em seguida, realizou-se o mesmo experimento alterando apenas a concentração de NaCl para 300 mM e observou-se que ambas as proteínas eram obtidas após eluição e as bandas visualizadas pareciam ser mais equimolares no gel, conforme observado na Figura 48B.

Figura 48 - Análise da purificação do complexo formado pelas proteínas SEPT7NGc e SEPT12G em SDS-PAGE 12 %. A) Purificação utilizando o tampão contendo 500 mM de NaCl; B) Tampão contendo 300 mM de NaCl. Nos géis estão representados: M) o marcador de baixo peso molecular; 1) alíquota antes da indução; 2) alíquota após a indução; 3) sobrenadante após lise; 4) *pellet*; 5) fração não ligada; 6) lavagem 1; 7) lavagem 2; 8) eluição.

Fonte: Elaborada pela autora.

A cromatografia de exclusão molecular foi realizada com o objetivo de avaliar o estado oligomérico da amostra e calcular a massa molecular do complexo. No cromatograma mostrado na Figura 49A, foram observados quatro picos e, desta forma, alíquotas foram retiradas para avaliar as massas correspondentes, conforme ilustrado na Figura 49C. As seis primeiras bandas no SDS-PAGE 12 % são correspondentes aos picos um e dois, respectivamente. Elas apresentaram apenas a banda de tamanho compatível com a proteína SEPT7NGc (aproximadamente 41,7 kDa), que pode estar interagindo entre si, formando um agregado de alta massa molecular. Em seguida, as bandas denominadas de 3 apresentam ambas as proteínas em concentrações aproximadamente equimolares, sendo assim considerada a fração de interesse. Por fim, as bandas denominadas de 4 apresentaram excesso de SEPT7NGc, provavelmente monomérica, e, assim, foram descartadas.

Figura 49 - Purificação do complexo em cromatografia de exclusão molecular. A) Perfil cromatográfico; B) Curva de calibração em coluna Superdex200; C) SDS-PAGE 12 % correspondente aos picos eluídos em A: M) marcador de massa molecular; 1) pico 1; 2) pico 2; 3) pico 3 e 4) pico 4.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para determinar a massa molecular aparente da fração que apresenta ambas as proteínas foram realizadas duas corridas cromatográficas contendo os padrões de massa moleculares. Construiu-se uma curva de calibração, ilustrada na Figura 49B, cuja reta que melhor ajustava os pontos é descrita pela equação: $y = 0,854 - 0,244x$. O valor de K_{AV} obtido para o complexo SEPT7NGc-SEPT12G foi de 0,30 e, por interpolação deste valor na equação da reta, obteve-se que a massa molecular aparente do complexo foi de 184,6 kDa.

O valor esperado para um dímero das proteínas que apresentam massa molecular teórica de 31,7 kDa para a SEPT12G e 41,7 kDa para a SEPT7NGc seria de, aproximadamente, 73,4 kDa.

No entanto, foi estimado uma massa molecular aparente de 184,6 kDa que pode indicar a formação de um complexo que provavelmente é um tetrâmero. Esta espécie pode ter sido formada pela interação promíscua entre o C-terminal da SEPT7NGc. Além disso, a obtenção da massa molecular esperada para uma proteína por cromatografia de exclusão molecular tem como desvantagem desvios causados pelos diferentes raios hidrodinâmicos. Estes podem variar tanto devido ao tamanho da proteína, quanto devido à forma desta. Um tetrâmero teria uma forma bastante alongada, que aumentaria o volume hidrodinâmico observado. Para determinar com precisão a massa molecular aparente desta espécie deverão ser realizados ensaios utilizando a técnica de SEC-MALS.

5.3.2 Análise do estado oligomérico por cromatografia de exclusão molecular acoplada a análise da dispersão de luz em vários ângulos (SEC-MALS)

Amostras do heterodímero SEPT7NGc-SEPT12 foram submetidas à cromatografia de exclusão por tamanho molecular. Em seguida, as alíquotas obtidas na eluição foram concentradas até 2,3 mg/mL. Estas amostras foram aplicadas em uma coluna Superdex200 analítica com o objetivo de determinar a massa molecular com maior precisão. Os perfis cromatográficos observados estão ilustrados na Figura 50.

Figura 50 - Dispersividade das amostras do heterodímero SEPT7NGc-SEPT12G analisadas pelo método de SEC-MALS. A curva em azul corresponde à leitura do espalhamento de luz a 90° (LS), em vermelho refere-se ao sinal do índice de refração diferencial (dRI) e o sinal em preto refere-se à distribuição de massa molecular para os picos obtidos. Em destaque encontra-se o gráfico do sinal obtido para o dRI *versus* o tempo, ampliado para melhor visualização.

Fonte: Elaborada pela autora.

Foram realizadas três medidas e, como podemos observar na Figura 50, dois picos foram obtidos, nos volumes de eluição iguais a 3,6 e 6,2 mL. Estes foram chamados de pico 1 e 2, respectivamente e os parâmetros obtidos para cada amostra e a média estão descritos na Tabela 13. O pico 1 apresentou alta massa molecular, igual a $22355,7 \pm 20130,3$ kDa, e polidispersividade de $1,329 \pm 0,184$, sugerindo tratar-se de um agregado. O pico 2 apresentou massa molecular igual a $72,36 \pm 4,53$ kDa e polidispersividade de $1,000 \pm 0,00$. Uma vez que a massa esperada para o heterodímero é de 75,7 kDa, os resultados sugerem que o heterodímero foi formado na condição utilizada e trata-se de uma espécie monodispersa. Os valores da massa de cada pico mostra que embora o agregado estivesse presente, a concentração deste na amostra é muito pequena.

Tabela 13 - Parâmetros obtidos para a análise de SEC-MALS do heterodímero SEPT7NGc-SEPT12G.

Amostra	Pico 1			Pico 2		
	Mw (kDa)	Polidispersividade	Massa (μ g)	Mw (kDa)	Polidispersividade	Massa (μ g)
1	7175,29 ($\pm 3,7\%$)	1,226 ($\pm 5,5\%$)	0,63	68,32 ($\pm 0,91\%$)	1,001 ($\pm 1,272\%$)	11,37
2	45190,30 ($\pm 4,8\%$)	1,541 ($\pm 9,2\%$)	0,63	77,26 ($\pm 5,47\%$)	1,000 ($\pm 7,724\%$)	5,79
3	14701,51 ($\pm 7,9\%$)	1,220 ($\pm 12,5\%$)	0,40	71,47 ($\pm 2,74\%$)	1,000 ($\pm 3,873\%$)	8,10
Média	22355,70	1,329	0,55	72,36	1,000	8,42
Desvio padrão	20130,21	0,184	0,13	4,53	0,000	2,81

* os valores dos erros são dados em porcentagem.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.4 Análise do conteúdo de nucleotídeo para o heterodímero SEPT7NGc-SEPT12

A análise do conteúdo de nucleotídeo do heterodímero foi realizada pela desnaturação por ácido perclórico [67]. O resultado, ilustrado na Figura 51, demonstra que a espécie foi obtida ligada ao nucleotídeo GDP, resultado esperado uma vez que ambas as proteínas são expressas ligadas ao GDP.

Figura 51 - Conteúdo de nucleotídeo para o heterodímero SEPT7NGc-SEPT12G.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a produção do heterodímero, as etapas de expressão e purificação foram eficazes, uma vez que a SEPT7NGc foi capaz de interagir com a SEPT12G e, assim, foram co-purificadas. O conteúdo de nucleotídeo demonstra a presença de GDP, esperada uma vez que ambas as proteínas são expressas ligadas a GDP e porque este nucleotídeo pode auxiliar na estabilização da interface. As etapas adicionais de purificação resultaram em amostras de alto grau de pureza, monodispersas, em concentrações que permitiam a sua utilização para ensaios de cristalização e com massa molecular próxima a esperada. No entanto, os ensaios de cristalização realizados para esta amostra resultaram conjuntos de dados com parâmetros de cela idênticos aos descritos na literatura para a SEPT7G (código de acesso ao PDB: 3TW4), Tabela 14, e, assim, concluímos que os cristais que foram formados continham apenas a SEPT7NGc. A dificuldade na obtenção de cristais para o heterodímero pode ser explicada pela instabilidade da SEPT12G que poderia estar precipitando fazendo com que a SEPT7NGc estivesse em excesso na gota. Outra hipótese levantada é que a condição de cristalização utilizada interferisse na interação entre as duas proteínas, dissociando-as.

Tabela 14 - Parâmetros de cela unitária para a estrutura da SEPT7 disponível na literatura e para o conjunto de dados obtidos para a espécie SEPT7NGc-SEPT12.

	Comprimento (Å)	Ângulo (°)
SEPT7	a = 82,510	$\alpha = 90,00$
	b = 82,510	$\beta = 90,00$
	c = 210,910	$\gamma = 120,00$
SEPT7-SEPT12	a = 83,02	$\alpha = 90,00$
	b = 83,02	$\beta = 90,00$
	c = 209,79	$\gamma = 120,00$

Fonte: Elaborada pela autora.

6 CONCLUSÃO

A SEPT12 é uma proteína chave para o estudo do subgrupo I uma vez que permitiu pela primeira vez caracterizar estruturalmente todas as proteínas membros de um subgrupo, tanto ligadas a GTP quanto a GDP, consolidando as informações observadas para a SEPT3 e SEPT9. Inicialmente, a proteína foi obtida complexada ao nucleotídeo GDP e no estado oligomérico de monômero. A determinação da fluorescência intrínseca dos triptofanos e a análise da atividade GTPásica permitiram concluir que a proteína estava enovelada e funcional, sendo assim no seu estado nativo.

As estruturas cristalográficas obtidas apresentavam dímeros de interface G. Nesta o motivo G4 destacou-se por apresentar uma diferença na SEPT12, o consenso que o define é xKxD, no entanto esta proteína apresenta um resíduo Arg195 no lugar da lisina, embora esta alteração não traga grandes mudanças em relação às interações que estabilizam o nucleotídeo, no contexto da interface G a Arg195 é capaz de interagir com a Ser198 das duas subunidades, levando a uma estabilização adicional desta interface. Além disso, a fosforilação deste resíduo pode atuar na desestabilização da interface.

Dentre os resultados obtidos neste trabalho, a mais notável contribuição foi a observação da interface NC obtida nas conformações aberta e fechada assimétrica. Estas interfaces contribuíram para consolidar as informações estruturais que já haviam sido exploradas para as proteínas SEPT3 e SEPT9. As diferentes possibilidades de interface NC, conformação aberta, conformação fechada e conformação fechada assimétrica, vista pela primeira vez neste trabalho, existentes neste subgrupo não permitam concluir se estas são um artefato do empacotamento cristalino ou se cada septina é diferente entre si, no entanto a plasticidade desta interface parece ser uma característica intrínseca desse subgrupo. Outro fator estrutural que se destaca é a orientação diferencial da hélice $\alpha 5'$, resultado da presença do resíduo Pro224 na configuração *cis* em um loop anterior à este elemento de estrutura secundária. A partir do resíduo de prolina a cadeia principal apresenta um desvio fazendo com que a hélice $\alpha 5'$ esteja em uma orientação paralela em relação à hélice $\alpha 2$. Nesta posição, o resíduo Arg149 é capaz de interagir com a Asp234 e formar contatos hidrofóbicos fundamentais para a formação da interface NC fechada.

A estrutura cristalográfica do mutante SEPT12^{T89M} permitiu observar que o resíduo Met89 não foi capaz de coordenar o íon Mg^{2+} que passa a interagir com uma molécula de água. Esta mudança pode fazer com que o mecanismo do *switch* universal, que auxilia na liberação do fosfato

γ , seja interrompido. Embora a observação de filamentos tenha sido possível para essa estrutura, ela apresentou a interface NC clássica, cujas interações que a compõem já estão bem descritas na literatura.

Os estudos da interação entre a SEPT12 e sua parceira SEPT7 resultaram na observação de que em altas quantidades de sal (500 mM de NaCl) a interação não ocorre, no entanto ao diminuí-la (300 mM de NaCl) foi possível obter o heterodímero. Este apresentou dois estados oligoméricos na análise por SEC-MALS, sendo um referente ao dímero e o outro a um agregado de elevada massa molecular. Embora os ensaios de cristalização tenham resultados em cristais, observou-se que nos cristais estavam presentes apenas a SEPT7 de forma que a SEPT12 pode ter precipitado levando a um excesso de SEPT7 na gota ou que a condição de cristalização tenha diminuído a interação entre as duas.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos demonstraram que a estabilidade da proteína SEPT12G deve ser trabalhada para que ensaios de interação com nucleotídeo e com proteínas possam ser realizados por meio de técnica como a calorimetria de titulação isotérmica (ITC). Para isso, a enzima fosfatase alcalina deverá ser utilizada com o objetivo de clivar o nucleotídeo GDP à qual a proteína é expressa ligada. Pretende-se ainda utilizar a mutação estudada em experimentos de co-expressão com a SEPT7NGc com o objetivo de verificar como a mutação afeta a associação com a proteína parceira. O heterodímero SEPT7NGc-SEPT12G será empregado em novos ensaios de cristalização utilizando-se diferentes kits de cristalização com o objetivo de obter uma condição em que a interação entre as proteínas não sejam enfraquecidas. Estudos relacionados ao fenômeno de fechamento da interface NC observados apenas para este subgrupo serão investigados com objetivo de determinar o aspecto funcional e fisiológico de sua ocorrência.

REFERÊNCIAS

- [1] MOSTOWY, S.; COSSART, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. **Nature Reviews**, v. 13, p. 183-194, 2012.
- [2] HARTWELL, L. H. Genetic control of the cell division cycle in yeast. **Experimental Cell Research**, v. 69, p. 265-276, 1971.
- [3] BYERS, B.; GOETSCH, L. A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. **The Journal of Cell Biology**, v. 69, p. 717-721, 1976.
- [4] GLADFELTER, A. S.; PRINGLE, J. R.; LEW, D. J. The septin cortex at yeast mother-bud neck. **Growth and development**, v. 4, p. 681-689, 2001.
- [5] CAO, L.; DING, X.; YU, W.; YANG, X.; SHEN, S.; YU, L. Phylogenetic and evolutionary analysis of the septin protein family in metazoan. **FEBS Letters**, v. 581, p. 5526-5532, 2007.
- [6] WEIRICH, C. S.; ERZBERGER, J. P.; BARRAL, Y. The septin family of GTPases: architecture and dynamics. **Nature Reviews**, v. 9, p. 478-489, 2008.
- [7] KINOSHITA, M. The septins. **Genome biology**, v. 4, n. 11, p. 236.1-236.9, 2003.
- [8] LONGTINE, M. S.; BI, E. Regulation of septin organization and function in yeast. **Trends Cell Biology**, v. 13, n. 8, p. 403-409, 2003.
- [9] DOBBELAERE, J.; BARRAL, Y. Spatial coordination of cytokinetic events by compartmentalization of the cell cortex. **Science**, v. 305, n. 5682, p. 393-396, 2004.
- [10] KANG, H.; LEW, D. J. How do cells know what shape they are?. **Current Genetics**, v. 63, p. 75-77, 2017.
- [11] SELLIN, M. E.; HOLMFELDT, P.; STENMARK, S.; GULLBERG, M. Microtubules support a disk-like septin arrangement at the plasma membrane of mammalian cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 22, p. 4588-4601, 2011.
- [12] BARRAL, Y.; PARRA, M.; BIDLINGMAIER, S.; SNYDER, M. Nim 1-related kinases coordinate cell cycle progression with the organization of the peripheral cytoskeleton in yeast. **Genes & Development**, v. 13, n. 2, p. 176-187, 1999.
- [13] SHULEWITZ, M. J.; INOUE, C. J.; THORNER, J. Hsl7 localizes to a septin ring and serves as an adapter in a regulatory pathway that relieves tyrosine phosphorylation of cdc28 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 10, 1999.

- [14] KUSCH, J.; MEYER, A.; SNYDER, M. P.; BARRAL, Y. Microtubule capture by the cleavage apparatus is required for proper spindle positioning in yeast. **Genes & Development**, v. 16, p. 1627-1639, 2002.
- [15] GRAVA, S.; SCHAEERER, F.; FATY, M.; PHILIPPSEN, P.; BARRAL, Y. Asymmetric recruitment of dynein to spindle poles and microtubules promotes proper spindle orientation in yeast. **Developmental Cell**, v. 10, n. 4, p. 425-439, 2006.
- [16] KARTMANN, B.; ROTH, D. Novel roles for mammalian septinas: from vesicle trafficking to oncogenesis. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 839-844, 2001.
- [17] FINGER, F. P.; KOPISH, K. R.; WHITE, J. G. A role for septinas in cellular and axonal migration in *C. elegans*. **Developmental Biology**, v. 261, p. 220-234, 2003.
- [18] IHARA, M.; YAMASAKI, N.; HAGIWARA, A.; TANIGAKI, A.; KITANO, A.; HIKAWA, R.; TOMIMOTO, H.; NODA, M.; TAKANASHI, M.; MORI, H.; NOBUTAKA, H.; TSUYOSHI, M.; KINOSHITA, M. Sept4, a component of presynaptic scaffold and lewy bodies, is required for the suppression of α -synuclein neurotoxicity. **Neuron**, v. 53, p. 519-533, 2007.
- [19] IHARA, M.; KINOSHITA, A.; YAMADA, S.; TANAKA, H.; TANIGAKI, A.; KITANO, A.; GOTO, M.; OKUBO, K.; NISHIYAMA, H.; OGAWA, O.; TAKANASHI, C.; ITOHARA, S.; NISHIMUNE, Y.; NODA, M.; KINOSHITA, M. Cortical organization by the septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa. **Developmental Cell**, v. 8, p. 343-352, 2005.
- [20] KISSEL, H.; GEORGESCU, M.; LARISCH, S.; MANOVA, K.; HUNNICUTT, G. R.; STELLER, H. The sept4 septin locus is required for sperm terminal differentiation in mice. **Developmental Cell**, v. 8, p. 353-364, 2005.
- [21] STEELS, J. D.; ESTEY, M. P.; FROESE, C. D.; REYNAUD, D.; PACE-ASCIAC, C.; TRIMBLE, W. S. Sept12 is a component of the mammalian sperm tail annulus. **Cell Motility Cytoskeleton**, v. 64, n. 10, p. 794-807, 2007.
- [22] BARRAL, Y.; MERMALL, V.; MOOSEKER, M. S.; SNYDER, M.; Compartmentalization of the cell cortex by septinas is required for maintenance of cell polarity in yeast. **Molecular Cell**, v. 5, p. 841-851, 2000.
- [23] TAKIZAWA, P. A.; DERISI, J. L.; WILHELM, J. E.; VALE, R. D. Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier. **Science**, v. 290, p. 341-344, 2000.
- [24] HALL, P. A.; RUSSEL, S. E. H. The pathobiology of the septin gene family. **Journal of Pathology**, v. 204, n. 4, p. 489-505, 2004.

- [25] 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.
- [26] DOLAT, L.; HU, Q.; SPILIOTIS, E. T. Septin functions in organ system physiology and pathology. **Biological Chemistry**, v. 395, n. 2, p. 123-141, 2014.
- [27] ZHANG, Y.; GAO, J.; CHUNG, K. 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 of the United States of America**, v. 97, n. 24, p. 13354-13359, 2000.
- [28] 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.
- [29] MACARA, I. G.; BALDARELLI, R.; FIELD, C. M.; GLOTZER, M.; HAYASHI, Y.; HSU, S.; KENNEDY, M. B.; KINOSHITA, M.; LONGTINE, M.; LOW, C.; MALTAIS, L. J.; MCKENZIE, L.; MITCHISON, T. L.; NISHIKAWA, T.; NODA, M.; PETTY, E. M.; PEIFER, M.; PRINGLE, J. R.; ROBINSON, P. J.; ROTH, D.; RUSSELL, S. E. H.; STUHLMANN, H.; TANAKA, M.; TANAKA, T.; TRIMBLE, W. S.; WARE, J.; ZELEZNIK-LE, N. J.; ZIEGER, B. Mammalian septinas nomenclature. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 4111-4113, 2002.
- [30] KINOSHITA, M. Assembly of mammalian septins. **The Journal of Biochemistry**, v. 134, p. 491-496, 2003.
- [31] NEUBAUER, K.; ZIEGER, B. The mammalian septin interactome. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 5, p. 1-9, 2017.
- [32] MARTÍNEZ, 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, p. 1388-1395, 2006.
- [33] VALADARES, N. F.; PEREIRA, H. M.; ARAUJO, A. P. U.; GARRATT, R. C. Septin structure and filament assembly. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 5, p. 481-500, 2017.
- [34] 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, p. 41-72, 2002.
- [35] 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.

- [36] CASAMAYOR, A.; SNYDER, M. Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and function. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 9, p. 2762-2777, 2003.
- [37] HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, Y.; MOMANY, M. Posttranslational modifications and assembly of septin heteropolymers and higher-order structures. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 660-668, 2012.
- [38] MARQUES, I. A.; VALADARES, N. F.; GARCIA, W.; DAMALIO, J. C. P.; MACEDO, J. N. A.; ARAUJO, A. P. U.; BOTELLO, C. A.; ANDREU, J. M.; GARRATT, R. C. Septin C-terminal domain interactions: implications for filament stability and assembly. **Cell Biochemistry Biophysics**, v. 62, p. 317-328, 2012.
- [39] JOHN, C. M. et al. The *Caenorhabditis elegans* septin complex is nonpolar. **EMBO Journal**, v. 26, n. 14, p. 3296-3307, 2007.
- [40] BERTIN, A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 24, p. 8274-8279, 2008.
- [41] KUO, Y.; LIN, Y.; CHEN, H.; WANG, Y.; CHIOU, Y.; LIN, H.; PAN, H.; WU, C.; SU, S.; HSU, C.; KUO, P. SEPT12 mutations cause male infertility with defective sperm annulus. **Human Mutation**, v. 33, n. 4, p. 710-719, 2012.
- [42] KUO, Y.; SHEN, Y.; CHEN, H.; LIN, Y.; WANG, Y.; CHEN, Y.; WANG, C.; KUO, P. SEPT12 orchestrates the formation of mammalian sperm annulus by organizing core octameric complexes with other SEPT proteins. **Journal of Cell Science**, v. 128, n. 5, p. 923-934, 2015.
- [43] SIRAJUDDIN, M.; FARKASOVSKY, M.; HAUER, F.; KÜHLMANN, D.; MACARA, I. G.; WEYAND, M.; STARK, H.; WITTINGHOFER, A. Structural insight into filament formation by mammalian septins. **Nature**, v. 449, n. 20, p. 311-317, 2007.
- [44] SIRAJUDDIN, M. et al. GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 39, p. 16592-16597, 2009.
- [45] KINOSHITA, M. Assembly of mammalian septins. **Journal of Biochemistry**, v. 134, n. 4, p. 491-496, 2003b.
- [46] SHEN, Y.; WANG, H.; KUO, Y.; SHIH, S.; HSU, C.; CHEN, Y.; WU, S.; WANG, C.; KUO, P. SEPT12 phosphorylation results in loss of the septin ring/sperm annulus, defective sperm motility and poor male fertility. **Plos Genetics**, v. 13, n. 3, p. 1-22, 2017.
- [47] 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.

- [48] DOBBELAERE, J.; GENTRY, M. S.; HALLBERG, R. L.; BARRAL, Y. Phosphorylation-dependent regulation of septin dynamics during the cell cycle. **Development Cell**, v. 4, n. 3, p. 345-357, 2003.
- [49] 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.
- [50] XUE, J.; WANG, X.; MALLADI, C. S.; KINOSHITA, M.; MILBURN, P. J.; LENGYEL, I.; ROSTAS, J. A.; ROBINSON, P. J. Phosphorylation of a new brainspecific septin, G-septin, by cGMP-dependent protein kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 14, p. 275-314, 2000.
- [51] KOCH, S.; ACEBRON, S. P.; HERBST, J.; HATIBOGLU, G.; NIEHRS, C. Post-transcriptional Wnt signaling governs epididymal sperm maturation. **Cell**, v. 163, n. 5, p. 1225-1236, 2015.
- [52] LIN, Y.; WANG, Y.; CHEN, H.; KUO, Y.; CHIOU, Y.; LIN, H.; WU, C.; HSU, C.; CHIANG, H.; KUO, P. SEPTIN12 genetic variants confer susceptibility to teratozoospermia. **Plos One**, v. 7, n. 3, p. 1-11, 2012.
- [53] RUSSELL, H. S. E.; HALL, P. A. Septin genomics: a road less travelled. **Biological Chemistry**, v. 392, p. 763-767, 2011.
- [54] SUGINO, Y.; ICHIOKA, K.; SODA, T.; KINOSHITA, M.; OGAWA, O.; NISHIYAMA, H. Septins as diagnostic markers for a subset of human asthenozoospermia. **Journal of Urology**, v. 180, n. 6, p. 2706-2709, 2008.
- [55] SHAHHOSEINI, M.; AZAD, M.; SABBAGHIAN, M.; SHAFIPOUR, M.; AKHOOND, M. R.; SALMAN-YAZDI, R.; GILANI, M. A. S.; GOURABI, H. New single nucleotide polymorphism G5508A in the SEPT12 gene may be associated with idiopathic male infertility in Iranian men. **Iran Journal of Reproductive Medicine**, v. 13, n. 8, p. 503-506, 2015.
- [56] SERRÃO, V. H.; ALESSANDRO, F.; CALDAS, V. E.; MARÇAL, R. L.; PEREIRA, H. D.; THIEMANN, O. H.; GARRATT, R. C. Promiscuous interactions of human septins: the GTP binding domain of SEPT7 forms filaments withon the crystal. **FEBS Letters**, v. 585, n. 24, p. 3868-3873, 2011.
- [57] MACEDO, J. N. A.; VALADARES, N. F.; MARQUES, I. A.; FERREIRA, F. M.; DAMALIO, J. C. P.; PEREIRA, H. M.; GARRATT, R. C.; ARAUJO, A. P. U. The structure and

properties of septin 3: a possible missing link in septin filament formation. **Biochemical Journal**, v. 450, p. 95-105, 2013.

[58] ZERAIK, A. E.; PEREIRA, H. M.; SANTOS, Y. V.; BRANDÃO-NETO, J.; SPOERNER, M.; SANTOS, M. S.; COLNAGO, L. A.; GARRATT, R. C.; ARAÚJO, A. P. U.; DEMARCO, R. Crystal structure of a *Schistosoma mansoni* septin reveals the phenomenon of strand slippage in septins dependent on the nature of the bound nucleotide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 11, p. 7799-7811, 2014.

[59] CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. Tradução de Henrique Bunselmeyer Ferreira. Porto Alegre: Artmed, 2000. Cap. 10, p. 361- 363.

[60] SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring, 2001. Cap 1, p. 1-1116.

[61] SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5473-5477, 1997.

[62] ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WLATER, P. **Biologia molecular da célula**. Tradução de Ana Letícia de Souza Vanz. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1728p.

[63] VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. Tradução de Ana Beatriz Gorino da Veiga. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 1202p.

[64] BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1288-1296, 2009.

[65] NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6.ed. New York: Artmed, 2014. 1298p.

[66] SHEEHAN, D. **Physical Biochemistry: principles and applications**. 2.ed. Chichester: John Wiley, 2009. Cap. 3, p. 64-75.

[67] SECKLER, R.; WUG, G. M.; TIMASHEFFEL, S. N. Interactions of tubulin with guanylyl-(P-y-Methylene)diphosphate: formation and assembly of a stoichiometric complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 13, n. 5, p. 7655-7661, 1990.

[68] RUPP, B. **Biomolecular crystallography: principles, practice, and application to structural biology**. New York: Gerland Science, 2010. Cap 3, p. 77-99.

[69] GIACOVAZZO, C.; MONACO, H. L.; VITERBO, D.; SCORDARI, F.; GILLI, G.; ZANOTTI, G.; CATTI, M. **Fundamentals of crystallography**. 2.ed. New York: Oxford University Press, 1992. Cap. 8, p. 535-538.

- [70] AGILENT TECHNOLOGIES. **QuickChange II site-directed mutagenesis kit**. Santa Clara, CA, USA, 2015. Disponível em: <https://agilent.com/cs/library/usermanuals/public/200523.pdf>. Acesso em: 04 maio 2018.
- [71] WYATT TECHNOLOGY. **Understanding multi-angle static light scattering**. Santa Barbara, 2018. Disponível em: <https://www.wyatt.com/library/theory/understanding-multi-angle-static-light-scattering.html>. Acesso em: 04 maio 2018.
- [72] SILVA, S. M. O. **Estudos de aspectos estruturais importantes na montagem de filamentos de septinas humanas**. 2016. 133 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.
- [73] SARASTE, M.; SIBBALD, P. R.; WITTINGHOFER, A. The P-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 15, n. 11, p. 430–434, 1990.
- [74] SCOTT, M.; HYLAND, P. L.; MCGREGOR, G.; HILLAN, K. J.; RUSSELL, S. E. H.; HALL, P. A. Multimodality expression profiling shows SEPT9 to be overexpressed in a wide range of human tumours. **Oncogene**, v. 24, n. 29, p. 4688–4700, 2005.