SABRINA MATOS DE OLIVEIRA DA SILVA

Estudos de aspectos estruturais importantes na montagem de filamentos de septinas humanas

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

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Richard Charles Garratt

SÃO CARLOS

2016

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida.

Ao meu orientador, Richard Charles Garratt, obrigada pela oportunidade, confiança e ensinamentos. Por me dar liberdade para criar e realizar meu trabalho, aprendendo com os erros e acertos. Muito obrigada!

A prof. Dr. Ana Paula Ulian de Araújo, pelo acolhimento no Laboratório de Biofísica e amizade.

Aos queridos técnicos do grupo de biofísica, Andressa, Bel e Fernando. Obrigado pelo acolhimento, prontidão em ajudar e pela amizade.

Aos técnicos da cristalografia Suzana e Humberto. Obrigada Humberto pelas inúmeras tardes auxiliando nas montagens das figuras.

Aos amigos e colegas do grupo de Biofísica e Cristalografia do IFSC em especial à Andressa, Juliana Chelesk, Helton Wirggers, Ana Eliza, Patricia, Militar e aos amigos que já não fazem mais parte do grupo, mas que foram muito muito importantes nessa jornada: Joci, Júlio e Zé Luis. Obrigada Diego pelas longas discussões estruturais, pela prontidão em ajudar e principalmente pela amizade. Todos excelentes profissionais com quem eu tive a honra de conviver e aprender todos esses anos.

Aos meus familiares: minhas mães guerreiras Romanilta Matos, Isabel Matos e Raimunda Marcos por sempre me incentivarem e apoiarem, ao meu irmão Raphael pela amizade e momentos de distração. Vocês foram fundamentais nessa jornada.

Agradeço ao meu marido Marcelo e minha filha Beatriz por me apoiarem e terem tido paciência comigo ao longo desses anos. Vocês foram meu suporte! Amo muito vocês.

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

Ao Instituto de Química de São Carlos, pela oportunidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado e apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

Septinas compreendem uma conservada família de proteínas de ligação a nucleotídeo de guanina, capaz de formar filamentos. No entanto, apesar de sua importância em vários eventos celulares, ainda há pouca informação disponível no que diz respeito aos detalhes de suas funções moleculares e o mecanismo que conduz a formação de hetero-oligômeros. O objetivo desta tese foi a clonagem, co-expressão e cristalização de septinas e seus complexos (SEPT9-SEPT11-SEPT7; SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9; SEPT4-SEPT6-SEPT7 e SEPT4-SEPT8-SEPT7) seguidas por análise estrutural comparativa. Os cDNAs que codificam as proteínas SEPT9, SEPT6, SEPT2, SEPT11, SEPT8, SEPT4, SEPT9GC α 0 (resíduos 262-568) e SEPT9GC (resíduos 279-568) foram clonados com sucesso e inseridos em vetores de expressão. O complexo que foi melhor caracterizado, foi o composto por SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9GC α 0, o qual foi confirmado por LC-MS/MS após digestão trípica, revelando a produção *in vitro* de um complexo de septina tetramérico. Além disso, caracterizou-se o hetero dímero formado por SEPT7NGc-SEPT9GC. No entanto, as proteínas que foram mais plenamente investigadas foram as construções SEPT9GC α 0 e SEPT9GC que foram estudadas individualmente para caracterizações biofísicas e estruturais. SEPT9GC α 0 apresentou-se bastante instável, porém, SEPT9GC foi eficientemente produzida e caracterizada. O estado oligomérico da proteína (monômero) foi confirmado por cromatografia de exclusão molecular. A proteína foi produzida na forma *apo* e foi capaz de hidrolisar GTP. A afinidade de SEPT9GC pelos nucleotídeos GDP e GTP γ S foi avaliada por Calorimetria de Titulação Isotérmica -ITC, revelando que SEPT9GC possui maior afinidade por GTP γ S, com K_d de 25,9 μ M, o qual é dependente do íon Mg^{2+} . Foram realizados ensaios de cristalização dessa proteína, que resultou em cristais que difrataram a alta resolução, com a proteína complexada a GDP ou GTP γ S. Interessantemente, a estrutura do complexo de SEPT9GC com o nucleotídeo GTP γ S foi obtido por *soaking* a partir de um cristal previamente obtido complexado com GDP. Este é o primeiro relato da aplicação deste método para septinas. Finalmente, obtivemos três conjuntos de dados cristalográficos, dois para SEPT9GC-GDP, com resolução de 2.8 Å e 2.1 Å e um conjunto de dados de SEPT9GC-GTP γ S obtido a 2.8 Å. Dentre as principais características observadas na estrutura de SEPT9GC, observou-se que a interface NC, responsável pela polimerização dos filamentos, se mostrou diferente dependendo do tipo de nucleotídeo ligado, com encurtamento do filamento na presença de GTP γ S. Isso indica a comunicação entre as interfaces consecutivas G e NC ao longo do filamento. A mudança conformacional observada na interface envolve o rearranjo dos resíduos que são altamente conservados em todas as septinas, bem como alguns que são específicos do grupo de SEPT9 e podem ter implicações para a montagem de filamentos e para a associação a membrana.

Palavras chaves: Septinas. SEPT9. Caracterização estrutural. Co-expressão.

ABSTRACT

Septins belong to a highly conserved family of guanine nucleotide binding proteins, capable of forming filaments. Despite their importance for several critical cellular events including cell division, little information is available about their molecular functions and the mechanism which leads to the formation of hetero-oligomers. The aim of this thesis was the cloning, co-expression and crystallization of septins and their complexes (SEPT9-SEPT11-SEPT7; SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9; SEPT4-SEPT6-SEPT7 and SEPT4-SEPT8-SEPT7), followed by comparative structural analysis. The cDNAs coding for the proteins SEPT9, SEPT6, SEPT2, SEPT11, SEPT8, SEPT4, SEPT9GC α 0 (residues 262-568) and SEPT9GC (residues 279-568) were successfully cloned into transferable or expression vectors. The best characterized complex was that composed of SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9GC α 0, which was confirmed by LC-MS/MS analysis after tryptic digestion, unveiling the *in vitro* production of a tetrameric septin complex. Additionally, we characterized the hetero-dimer formed by SEPT7NGc-SEPT9GC. However, the most fully investigated proteins were the constructs SEPT9GC α 0 and SEPT9GC which were studied individually for biophysical and structural characterizations. SEPT9GC α 0 was highly unstable contrasting with SEPT9GC that was efficiently produced and characterized. The presence of the oligomeric state of SEPT9GC (monomer) was confirmed by molecular exclusion chromatography. The protein was produced in the *apo* form and was capable of hydrolyzing GTP. The affinity of SEPT9GC for GDP and GTP γ S nucleotides was evaluated by Isothermal Titration Calorimetry (ITC) revealing that SEPT9GC has a higher affinity for GTP γ S, with a K_d of 25.9 μ M, which is dependent on the presence of Mg^{2+} . Crystallization studies of this protein were performed, obtaining high quality crystals of protein complexes with GDP and GTP γ S. Interestingly, the structure of the complex of SEPT9GC with the nucleotide GTP γ S was obtained by *soaking* a previously grown crystal of the GDP complex. This is the first report of the application of this method for septins. Finally, we have obtained three sets of crystallographic data, two for SEPT9GC-GDP, at resolutions of 2.8 Å and 2.1 Å, and one set of data for SEPT9GC-GTP γ S at 2.8 Å. Among the main characteristics observed in the SEPT9GC structure is the NC interface responsible for filament polymerization, which is shown to vary according to the type of bound nucleotide, with foreshortening of the filament in the presence of GTP γ S. This indicates communication between consecutive G and NC interfaces along the filament. The conformational change at the interface involves the rearrangement of residues which are highly conserved in all septins as well as several which are SEPT9 group specific and may have implications for filament assembly and membrane association.

Key words: Septins; SEPT9; structural characterization; co-expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização das septinas durante o ciclo celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . A) Septinas no estágio final do processo de divisão celular, obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. As setas indicam a localização do anel no septo. Barra de 0,1 μ m. B) Complexo em forma de anel contendo as septinas 2, 6, 7. Escala representada em 100 nm. C) Septinas durante a citosinese, visualizada por microscopia de fluorescência.	16
Figura 2: Caracterização e organização estrutural das septinas humanas. A) Diagrama esquemático dos domínios de uma septina. Em preto está destacado a região polibásica, possível região de ligação a membrana plasmática e em cinza a região SUE (Elemento Único de Septina) e também a região coiled-coil. B) Classificação das septinas de mamíferos considerando seus domínios estruturais.	20
Figura 3: Homofilamentos de septinas. A) Sept2 de <i>Xenopus laevis</i> na presença de GTP γ S. Barra de 100 nm; C) SEPT2 humana na presença de GTP. Barra de 100 nm; SEPT4 humana na presença de GTP. Barra de 1000 nm.	22
Figura 4: Estrutura do complexo formado pelas septinas humanas SEPT2-SEPT6-SEPT7. Aqui as interfaces de interação entre as septinas estão indicadas por NC e G. A vizinhança do hexâmero marca os contatos longitudinais utilizando a SEPT7 (em cinza). A posição e orientação dos domínios coiled-coil, estão indicados pelas setas pretas. A natureza dos nucleotídeos nas subunidades está indicada por GTP e GDP.	23
Figura 5: Modelo esquemático de complexos de septinas em hexâmeros e octâmeros. A) Heterocomplexo 2/6/7; B) Complexo canônico com a adição de SEPT9 na extremidade.	27
Figura 6: Métodos de cristalização de proteínas. Em A está representado o método de Hanging drop (gota suspensa) e em B o método de Sitting drop (gota sentada). A solução do reservatório (solução de cristalização) é diluída na proteína inicialmente a uma proporção de volume 1:1. Uma vez, que a solução de cristalização se encontra mais concentrada, ocorre uma difusão de vapor entre a gota suspensa ou sentada para o reservatório. Como resultado desse processo, a proteína vai sendo concentrada gradativamente.	37
Figura 7: Amplificação dos cDNAs de interesse. Marcador) Padrão de pares de base 1kb DNA Ladder (Fermentas). A - Insertos referentes a SEPT4NGC (~1437 pb), SEPT6NGC (~1284 pb), SEPT9NGC (~1707 pb) e SEPT8NGC (~1287 pb); B - Insertos referentes a SEPT11NGC (~1480 pb) e SEPT2NGC (~1086 pb) e C - Inseto referente a SEPT9 α 0 (~921 pb).	48
Figura 8: Confirmação dos clones recombinantes por análise de restrição. 1) Padrão de pares de base 1 kb DNA Ladder (Fermentas). 2: plasmídeo recombinante pRSF::SEPT4 clivado com NdeI e XhoI, 3: plasmídeo recombinante pACYC::SEPT6 clivado com NcoI e Sall, 4: plasmídeo recombinante pRSF::SEPT2 clivado com NdeI e XhoI, 5: plasmídeo recombinante pETDuet::SEPT9 clivado com NdeI e XhoI, 6: plasmídeo recombinante pACYC::SEPT11 clivado com NcoI e Sall, 7: plasmídeo recombinante pETDuet::SEPT8 clivado com NdeI e XhoI e 8: plasmídeo recombinante pETDuet::SEPT9 α 0 clivado com NdeI e XhoI.	49
Figura 9: Modelos de organização das septinas nos complexos: A) Complexo canônico 2/6/7. B) Complexo canônico 2/6/7 com a adição da SEPT9 na extremidade. C) Complexo 4/6/7 com SEPT4 substituindo SEPT2. D) Complexo 4/8/7 com SEPT4 substituindo SEPT2 e SEPT8 substituindo SEPT6. E) Complexo 9/11/7 com a possibilidade de SEPT9 substituir SEPT2 e SEPT11 substituir SEPT6 pertencentes ao mesmo grupo. C) Complexo 9/11/7 no caso de um octâmero, onde haveria duas cópias de SEPT9 para apenas uma cópia das outras septinas.	52
Figura 10: Gel poliácridamida 12% contendo amostras das proteínas SEPT2NGC, SEPT6NGC, SEPT7NGC e SEPT9GC α 0. Marcador: MM Page Ruler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas). A) Expressão das proteínas SEPT2NGC (41 kDa) e SEPT6NGC (49 kDa). B) Expressão das proteínas SEPT7NGC (50 kDa) e SEPT9GC α 0 (34 kDa).	53

- Figura 11:** Gel de poliacrilamida 12% contendo amostras do complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEP9GC α 0 após cromatografia de afinidade ao cobalto. MM - MM Page Ruler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas). 1 - Fração solúvel do extrato proteico; 2 - Proteínas que não ligaram a resina de afinidade; 3 - Corresponde a lavagem da resina com 15 mM de imidazol e 4 - Corresponde a frações de proteínas eluídas da resina na presença de 300 mM de imidazol..... 54
- Figura 12:** Purificação do complexo formado pelas septinas humanas 2/6/7/9. Cromatografia de exclusão molecular do complexo 2/6/7/9 realizada em coluna Superdex 200 usando um dispositivo AKTA sob um fluxo de 0,5 mL/min e fracionamento de 0,5 mL. O volume de exclusão da coluna foi determinado usando Blue Dextran e a amostra de Ferritina foi usada para comparação com o complexo. O pico 1 corresponde a agregados protéicos que saiu no volume de exclusão da coluna e o pico 2 ao complexo 2/6/7/9. 56
- Figura 13:** Análise de SDS-PAGE 12 % das amostras do complexo 2/6/7/9 após cromatografia de exclusão molecular. A - M) Marcador de massa molecular; 1 - Fração referente ao pico 1 (Void) e de 2-4 - Frações referentes ao segundo pico que corresponde as proteínas que incluíram na coluna. B- Amostra concentrada das frações 2-4 referente ao pico 2. 57
- Figura 14:** Gel de poliacrilamida 12% contendo amostra do heterodímero SEPT7NGc-SEP9GC α 0 após purificação de afinidade ao Co²⁺. M) Padrão de massa molecular: MM PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas); 1) Fração das proteínas solúveis; 2) Fração das proteínas que não ligaram na resina de cobalto; 3) Lavagem da coluna com tampão contendo 7 mM de imidazol; 4) Eluição do complexo com 250mM de Imidazol; 5) Eluição do complexo com 500 mM e 6) Eluição do complexo com 1 M de Imidazol..... 58
- Figura 15:** Cromatografia de exclusão molecular do complexo SEPT7NGc-SEP9GC α 0 e análise por SDS-PAGE 12%. A) Cromatografia de exclusão molecular do heterodímero SEPT7NGc-SEP9 α 0 realizada em coluna Superdex 200. Perfil cromatográfico dos padrões utilizados juntamente com o complexo: Blue Dextran usado para determinar o volume de exclusão da coluna; Perfil cromatográfico dos padrões Aldolase (158 kDa), Ovalbumina (44 kDa) e Ribonuclease (13,7 kDa). B) Análise do heterodímero após cromatografia de exclusão molecular em gel de poliacrilamida 12%; M - Padrão de massa molecular *PageRuler™ Unstained Protein Ladder* (Fermentas); 1 - Amostra de 7NGc-9GC α 0 concentrada aplicada na coluna de exclusão molecular; 2 e 3 - frações referentes ao pico 1 que saíram no *void* da coluna; 4, 5 e 6 - frações referentes ao pico 2 que correspondem a amostras do heterodímero que incluiu na coluna; 7 - fração referente ao pico 3 que corresponde a um excesso de SEPT9GC α 0..... 60
- Figura 16:** Mapa da estrutura secundária de SEPT9. O programa PSIPRED foi usado para determinar a estrutura secundária de SEPT9 com os parâmetros padrões do programa. Características correspondentes as predições são codificadas por cores onde as regiões coloridas em rosa () corresponde as hélices, as coloridas em amarelo () correspondem as fitas e as regiões não coloridas correspondem a estruturas desordenadas e/ou regiões de conexão (*loops*) das estruturas secundarias. Os domínios de SEPT9 encontram-se divididos em quatro caixas coloridas, onde: cinza corresponde ao N-terminal da proteína, verde a sequência de aminoácidos que corresponde a hélice α 0, vermelho ao domínio GTPase e azul ao C-terminal da proteína..... 62
- Figura 17:** Clivagem do plasmídeo recombinante SEPT9GC::pET28a(+). MM) Padrão de massa molecular 1kb DNA Ladder (Fermentas). As demais canaletas representam o plasmídeo recombinante clivado com *NdeI* e *XhoI* liberando o inserto de interesse. 63
- Figura 18:** Gel de poliacrilamida 12% contendo amostra da SEP9GC após cromatografia de afinidade ao Cobalto. M) Padrão de massa molecular: MM *PageRuler™ Unstained Protein Ladder* (Fermentas); 1) Fração solúvel da proteína; 2) Fração solúvel de proteínas que não ligou na coluna; 3) Lavagem da coluna com tampão contendo 15 mM de Imidazol e 0,1 % de detergente; 4) Eluição de SEP9GC com 50 mM de Imidazol; 5) Eluição de SEP9GC com 250 mM de Imidazol; 6) Eluição de SEP9GC com 500 mM de Imidazol; 7) Eluição de SEP9GC com 700 mM de Imidazol e 8) Eluição de SEP9GC com 1 M de Imidazol..... 63

Figura 19: Perfil cromatografica de SEPT9GC (34 kDa) e SEPT9GC α 0 (37 kDa) em coluna Superdex 200 acoplada ao AKTA Purifier. Tampão Tris-NaCl 25 mM, NaCl 300 mM, MgCl ₂ 5 mM, Glicerol 12% e β -mercaptoetanol 5 mM; pH 7,8. A) Perfil cromatográfico de SEPT9GC; B) Comparação do perfil cromatográfico de SEPT9GC e SEPT9GC α 0.	64
Figura 20: Estimativa da MM aparente de SEPT9GC utilizando cromatografia de exclusão molecular. A) Curva de calibração das proteínas padrões obtidos a partir da regressão linear dos volumes de eluição, inferindo a localização da SEPT9GC na reta. B) Perfis cromatográficos dos padrões juntamente com SEPT9GC: aldolase (158 kDa), ovalbumina (44 kDa), ribonuclease (13,7 kDa); Conalbumina (75 kDa) e Anidrase Carbônica (29 kDa); Ferritina (440 kDa); SEPT9GC e Blue Dextran foi utilizado para determinar o valor de exclusão da coluna.	65
Figura 21: Espectros de CD de SEPT9GC. A) Espectro de CD de SEPT9GC (7,5 μ M) a 20 °C em tampão Fosfato de Sódio 10 mM, NaCl 50 mM, Glicerol 5% e MgCl ₂ 5 mM; pH 7,8. B) Comparação dos espectros de CD da proteína SEPT9GC (7,5 μ M) quando ligada a GDP e/ou GTP γ S (22,5 μ M).	66
Figura 22: Análise do teor de nucleotídeo da SEPT9GC. A proteína e ambos nucleotídeos estavam a uma concentração de 200 μ M. Todas as amostras passaram por tratamento com ácido hiperclórico e o sobrenadante foi analisado por HPLC em uma coluna de troca aniônica. A cromatografia foi realizada sob um fluxo de 1 mL/min a temperatura ambiente.	67
Figura 23: Análise da atividade GTPase da SEPT9GC. SEPT9GC (20 μ M) foi incubada com 60 μ M de GTP durante 5 h a 20 °C. A) Sobreposição de nove cromatogramas referentes a reação de hidrólise de GTP, os demais cromatogramas foram omitidos para uma melhor visualização dos resultados. B) Porcentagem de hidrólise de GTP e subsequente porcentagem de formação de GDP ao longo do tempo.	68
Figura 24: Isotermas de titulação de SEPT9GC. (A) SEPT9GC 24 μ M, em tampão fosfato na presença de 5 mM de MgCl ₂ titulada com 0,8 mM de GTP γ S; (B) SEPT9GC, 24 μ M, em tampão fosfato, 1 mM de EDTA na ausência de MgCl ₂ titulada com 0,8 mM de GTP γ S SEPT9 α 0, (C) SEPT9GC 15 μ M, em tampão fosfato na presença de 5 mM de MgCl ₂ titulada com 3 mM de GDP.	71
Figura 25: Representação esquemática das interações septina-septina esperadas dentro do heterofilamento, baseadas em dados de ensaios de duplo híbrido em levedura. Nesta figura está ilustrado a possível disposição da SEPT9 dentro do complexo SEPT2 -SEPT6-SEPT7, assim como a sua interface G e NC.	73
Figura 26: Cristais de SEPT9GC. Cristais obtidos na co-cristalização de SEPT9GC a 4,2 mg/mL e 1,5 mM de GDP, condição de cristalização: PEG 1500 24% e Glicerol 20%.	74
Figura 27: Transformação da cela unitária de SEPT9GC influenciada pela troca do nucleotídeo. Em azul esta destacada a cela unitária de SEPT9GC-GDP e em vermelho a cela unitária de SEPT9GC-GTP γ S. O homofilamento gerado por SEPT9GC está representado na cor salmão.	77
Figura 28: Alinhamento do domínio GTPase das septinas humanas e SmSEPT10. Os aminoácidos conservados para cada sub-grupo de septinas são mostrados em cores: verde, azul, vermelho e amarelo para os sub-grupos correspondentes a SEPT3, SEPT6, SEPT2 e SEPT7 respectivamente. Os elementos de estrutura secundária são mostrados na sequência de SmSEPT10 em laranja para as β -fitas e violeta para α -hélices. As regiões estruturais que são importantes e comuns a pequenas GTPases são mostradas em caixas transparentes e os motivos específicos de septinas são mostrados em caixas sombreadas.	79
Figura 29: Estrutura de SEPT9GC-GDP a 2.1 Å. Obteve-se um dímero na unidade assimétrica do cristal. A ordem das β -fitas e as α -hélices encontram-se enumeradas no monômero da direita; as β -fitas estão representadas em azul e as α -hélices em vermelhas.	81
Figura 30: Homofilamento presente no cristal de SEPT9GC a 2.1 Å de resolução. A cadeia 'A' está representada na cor verde e a cadeia 'B' na cor ciano. As interfaces G e NC encontram-se destacadas na figura.	82
Figura 31: Homofilamento presente no cristal de SEPT9GC a 2.1 Å de resolução. A cadeia 'A e B' estão representadas na cor ciano e a região do SUE encontra-se colorida em azul.	83

Figura 32: Interfaces da estrutura SEPT9GC-GDP a 2.1 Å. A cadeia ‘A’ está representada na cor verde e a cadeia ‘B’ na cor ciano. Os nucleotídeos associados a cada molécula também estão representados marcados com as setas.....	84
Figura 33: Resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação de SEPT9GC a GDP e ao Mg^{2+} . O GDP está ligado no centro da figura, e apresenta cadeia carbônica representada na cor marrom e o íon Mg^{2+} em verde.	85
Figura 34: Resíduos de aminoácidos envolvidos na coordenação do íon Mg^{2+} por SEPT9GC. O íon Mg^{2+} está representado em verde e as moléculas de água em vermelho. Densidade $2F_{obs}-F_{calc}$	87
Figura 35: Estruturas de SEPT9GC-GDP a 2.1 Å destacando o loop que corresponde aos resíduos 36-54. A) Estrutura de SEPT9GC-GDP evidenciando as regiões com maiores valores de B_{factor} (regiões coloridas em vermelho, amarelo e alaranjado). B) Ligações de hidrogênio feita pelos resíduos Glu45 e Thr43 (correspondente ao loop que conecta hélice $\alpha 1$ e fita $\beta 2$) com a fita $\beta 9$	88
Figura 36: Comparação da orientação da hélice $\alpha 5'$ de SEPT3, SEPT9 e SEPT2. A) Sobreposição das estruturas de SEPT3 (código 3SOP), SEPT9 (código 5CYO) e SEPT2 (código 2QNR), coloridas em verde, ciano e vermelho respectivamente. B) Sobreposição das estruturas de SEPT3 (verde) e SEPT9 (ciano) mostrando a interação hidrofóbica da Phe203 com Val276 e Ile280 na estrutura de SEPT3 e com Ile276 e Ile280 na estrutura de SEPT9	90
Figura 37: Interface NC de SEPT3GC-GDP, apresentando em superfície as regiões carregadas correspondentes a contatos importantes para formação da interface NC. Em azul está apresentados os resíduos carregados positivamente (provinientes da subunidade da esquerda) em vermelho os resíduos carregados negativamente (provinientes da subunidade da direita). As interações estão mostradas em um lado da interface.	91
Figura 38: Interface NC das septinas 3, 9, 6, 2 e 7. Do lado direito está apresentado as interfaces NC das septinas complexadas a GTP e do lado esquerdo as interfaces NC das septinas complexadas a GDP. O Grupo I é o único que apresenta dois representantes (SEPT3 e SEPT9). As interfaces estão coloridas nas cores correspondentes ao grupo que pertencem.....	93
Figura 39: Interface NC de SEPT9 e SEPT3 com GDP. A) Interface de interação NC de SEPT9GC-GDP. B) Interface de interação NC de SEPT3GC-GDP. Para ambas estruturas a cadeia A está representada na cor ciano e a cadeia B na cor verde.	94
Figura 40: Sobreposição dos monômeros de SEPT3GC-GDP e SEPT9GC-GDP. A) Sobreposição dos monômeros inteiros das estruturas de SEPT9 e SEPT3. B) Destaque dos loops que conectam a $\alpha 2$ com a $\beta 4$. SEPT3GC-GDP está representada na cor verde e SEPT9GC-GDP está representada na cor azul.	96
Figura 41: Características estruturais de SEPT9GC-GDP a 2.1 Å. A) Filamentos gerados pela estrutura de SEPT9GC-GDP. B) Resíduos responsáveis pelas contatos dos filamentos.	97
Figura 42: Interface NC de SEPT9 e SEPT2 com GDP. A) Interface de interação NC de SEPT9GC-GDP e SEPT2-GDP, para ambas estruturas a cadeia A está representada na cor ciano e a cadeia B na cor verde.....	98
Figura 43: Sobreposição da interface NC de SEPT2-GDP (código 2QA5) e SEPT3-GDP (código 4Z54). SEPT2 encontra-se colorida em vermelho e SEPT3 em verde. Enquanto a hélice $\alpha 0$ se dobra para dentro da interface NC em SEPT2, em SEPT3 se encontra exposta.	99
Figura 44: Estrutura de SEPT9GC-GTP γ S. Quatro monômeros contidos na unidade assimétrica do cristal. O nucleotídeo GTP γ S está apresentado na estrutura na cor laranja.	100
Figura 45: Mapa de densidade eletrônica calculadas com coeficientes $2F_{obs}-F_{calc}$ (azul) e $F_{obs}-F_{calc}$ (verde) da estrutura de SEPT9GC-GTP γ S. A) Refinamento da estrutura com GTP γ S. B) Refinamento da estrutura com GDP. As regiões destacadas em vermelho correspondem a erros no refinamento. A densidade positiva no mapa (verde) corresponde a falta de átomos, indicativo da presença de um fosfato γ	101
Figura 46: Filamentos de SEPT9GC-GDP (código 5CY0) e SEPT3GC-GDP (código 4Z54) gerados por simetria cristalográfica. Na figura os filamentos estão representados saindo da página, e o leitor,	

portanto olhando ao longo do seu eixo principal. O filamento central está representado na cor azul e os filamentos em volta gerados por simetria na cor vermelho. Em ‘A’ está representado os filamentos SEPT9GC-GDP e em ‘B’ SEPT3GC-GDP.	103
Figura 47: Empacotamento cristalino de SEPT3-GDP (código 4Z54) visto ao longo de duas direções perpendiculares. Um dos filamentos está destacado em cinza (representação de superfície) e os demais em vermelho. A hélice $\alpha 0$ (saindo do filamento cinza) está representada na cor amarelo e fica alojada entre subunidades de dois filamentos vermelhos.	104
Figura 48: Sobreposição dos monômeros de SEPT9 complexado a GDP e GTP γ S. As estruturas estão representadas na cor ciano para a forma complexada a GDP e em amarelo para a forma complexada a GTP γ S. Destacadas em caixas encontram-se as regiões que apresentam diferenças	105
Figura 49: Sobreposição da região do P-loop das estruturas de SEPT9GC-GTP γ S e SEPT9GC-GDP. Em A e B respectivamente estão representados os nucleotídeos GTP γ S e GDP em esferas. Em ambos, o P-loop está representado em amarelo (complexo com GTP γ S) e azul (com GDP).	106
Figura 50: Resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação do nucleotídeo via fosfato γ no caso de SEPT3GC complexado a GppNHP (A) e SEPT9GC complexado a GTP γ S (B).	107
Figura 51: Resíduos de aminoácidos envolvidos na coordenação do íon Mg^{2+} na estrutura de SEPT9GC-GTP γ S. O íon Mg^{2+} está representado em verde.	108
Figura 52: Sobreposição dos dois dímeros da unidade assimétrica em torno da interface NC de SEPT9GC-GTP γ S. Os dímeros são diferenciados na figura por cores, onde a interface NC gerada por um dos dímeros (cadeia A e B) está representada na cor verde e a do outro dímero (cadeia C e D) na cor amarelo. Um monômero de cada dímero está representado do lado esquerdo da figura e o outro do lado direito. Hélices $\alpha 2$ e $\alpha 6$ são indicadas explicitamente para facilitar compreensão.	109
Figura 53: Sobreposição das interfaces NC de SEPT9GC-GDP e SEPT9GC-GTP γ S. A estrutura de SEPT9GC complexada com GDP está representada na cor ciano e a estrutura complexada a GTP γ S em amarelo.	110
Figura 54: Homofilamentos de SEPT9 observada no cristal. A) Homofilamento de SEPT9 complexada com GDP, onde é possível observar uma interface NC aberta. B) Homofilamento de SEPT9 complexada com GTP γ S, onde é possível observar uma interface NC apertada quando comparada com SEPT9-GDP.	111
Figura 55: Representação das duas interfaces NC de SEPT9GC complexada a GTP γ S.	113
Figura 56: Proposta de polimerização de um filamento de septinas baseado em octâmeros. A) Heterofilamento formado por um representante de cada grupo (mostrado em cores), destacando a interface NC de SEPT9 como essencial para a polimerização do filamento. B) Disposição da hélice $\alpha 0$ em uma interface NC de SEPT9 dependendo do nucleotídeo ao qual encontra-se ligado. Em uma interface NC com duas SEPT9 complexada a GTP, a interface NC é apertada com a hélice $\alpha 0$ exposta para fora, a qual estaria disponível para interagir com a membrana celular. Após a hidrólise do GTP e formação de GDP, a interface NC do filamento se abre para acomodar a hélice $\alpha 0$ dentro da interface.	114
Figura 57: Sobreposição das fitas- β (1, 2 e 3) das estruturas de SEPT9GC ligadas a GDP e GTP γ S. A estrutura de SEPT9GC-GDP está representada na cor ciano e a estrutura de SEPT9GC- GTP γ S na cor salmão.	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Septinas em organismos modelos.	17
Tabela 2: Localização dos genes de septinas e as patologias as quais estão relacionadas.	26
Tabela 3: Sequência de oligonucleotídeos utilizados para amplificar os DNAs alvos. Os sítios de para reconhecimento das enzimas de restrição encontram-se destacados em azul.	30
Tabela 4: Combinações das septinas e plasmídeos utilizados na co-expressão dos complexos.	33
Tabela 5: Combinação dos plasmídeos utilizados para transformar em <i>E. coli</i>	34
Tabela 6: Sequência de oligonucleotídeos utilizados para amplificar o cDNAs de SEP79GC. Os sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição encontram-se destacados em azul.	38
Tabela 7: Ensaios robóticos de cristalização para SEPT9GC. Volume da amostra : volume da solução precipitante (1 : 1). A condição de cristalização de SEPT9GC está destacada em verde.	45
Tabela 8: Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir das titulações de SEPT9GC com os nucleotídeos de guanina na presença 5 mM de Mg^{2+}	72
Tabela 9: Coleta de dados e parâmetros do refinamento.	75

LISTA DE ABREVIATURAS DE SIGLAS

ACN	Acetonitrila
CD	<i>Circular Dichroism</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GDP	Guanosina-5'-difosfato
GppNHP	Guanosina-5'-[(β,γ)-imido]trifosfato
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
GTP γ S	Guanosina-5'(γ -tio)-trifosfato
HEPES	Ácido Etanosulfônico 4-2 hidroxietil-1-piperazira
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>
K _a	Constante de ligação
K _D	Constante de dissociação
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida de Espectrometria de Massas
MM	Massa Molecular
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
PEG	Polietilenoglicol
<i>P-loop</i>	Loop de interação com o fosfato
SDS	Dodecil sulfato de Sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide electrophoresis</i>
SEC	Cromatografia de exclusão molecular
U	Unidade
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo

LISTA DE AMINOÁCIDOS

Nome	Símbolo	Abreviação	Característica
Arginina	Arg	R	Cadeia lateral carregada positivamente
Histidina	His	H	Cadeia lateral carregada positivamente
Lisina	Lys	K	Cadeia lateral carregada positivamente
Ácido aspártico	Asp	D	Cadeia lateral carregada negativamente
Ácido Glutâmico	Glu	E	Cadeia lateral carregada negativamente
Serina	Ser	S	Cadeia lateral polar não carregada
Threonina	Thr	T	Cadeia lateral polar não carregada
Asparagina	Asn	N	Cadeia lateral polar não carregada
Glutamina	Gln	Q	Cadeia lateral polar não carregada
Cisteína	Cys	C	Cadeia lateral polar não carregada
Glicina	Gly	G	Cadeia lateral polar não carregada
Tirosina	Tyr	Y	Cadeia lateral polar não carregada
Prolina	Pro	P	Cadeia lateral apolar
Alanina	Ala	A	Cadeia lateral apolar
Valina	Val	V	Cadeia lateral apolar
Isoleucina	Ile	I	Cadeia lateral apolar
Leucina	Leu	L	Cadeia lateral apolar
Metionina	Met	M	Cadeia lateral apolar
Fenilalanina	Phe	F	Cadeia lateral apolar
Triptofano	Trp	W	Cadeia lateral apolar

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	15
1.1 Septinas	15
1.2 Domínios Estruturais e classificação das Septinas humanas	18
1.3 Septinas e formação de filamentos	21
1.4 Complexos de septinas humanas	22
1.5 Septinas: funções e patologias	24
1.6 Septina 9 humana	27
2.0 OBJETIVO	29
2.1 Objetivos específicos	29
3.0 – MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 - Complexos de septinas	30
3.1.1 - Clonagens das sequências codificadoras de SEPT2, SEPT4, SEPT6, SEPT9, SEPT11 e SEPT8 no plasmídeo de propagação, pGEM -T	30
3.1.2 - Subclonagem das sequências codificadoras de SEPT2, SEPT4, SEPT6, SEPT9, SEPT9GC α 0, SEPT11 e SEPT8 em plasmídeos do sistema pETDuet	32
3.1.3 Co - expressão dos complexos proteicos em <i>E. coli</i>	34
3.1.4 Purificação dos complexos proteicos	35
3.1.5 Espectrometria de massa	36
3.1.6 Ensaios de cristalização dos complexos de septinas	37
3.2 CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA E ESTRUTURAL DE SEPT9GC	38
3.2.1 Clonagem e Expressão de SEPT9GC α 0 e SEPT9GC	38
3.2.2 Expressão de SEPT9GC α 0 e SEPT9GC	39
3.2.3 Purificação das proteínas SEPT9GC α 0 e SEPT9GC	39
3.2.4 Determinação da massa molecular aparente de SEPT9GC	40
3.2.5 Dicroísmo Circular	41
3.2.6 Análise do teor de nucleotídeo e da atividade GTPásica de SEPT9GC	42
3.2.7 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)	43
3.2.8 Co-cristalização de SEP9GC	44
3.2.10 Coleta de dados e resolução da estrutura	46
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Amplificação e clonagem dos cDNAs que codificam as proteínas alvo do projeto	48
4.2 Expressão, solubilidade e purificação dos complexos proteicos	50
4.2.1 Complexo 2/6/7/9GC α 0	53

4.2.2 Complexo SEPT7NGc- SEPT9GC α 0	58
4.3 Clonagem e expressão de SEPT9GC	61
4.3.1 Determinação da massa molecular de SEPT9GC	64
4.3.2 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD).....	65
4.3.4 Análise do teor de nucleotídeo e Atividade GTPásica de SEPT9GC	67
4.3.5 Avaliação da ligação dos nucleotídeos por Calorimetria de Titulação Isotérmica – ITC	69
5.0 ESTRUTURAS DE SEPT9	72
5.1 Ensaios de cristalização de SEPT9GC-GDP	73
5.2 Análise da estrutura de SEPT9GC-GDP	77
5.2.1 Interface G de SEPT9GC-GDP	84
5.2.2 Interface NC de SEPT9GC-GDP	88
5.3 Análise da estrutura de SEPT9GC-GTP γ S	100
5.3.1 Interface G de SEPT9GC-GTP γ S	104
5.3.2 Interface NC	108
5.3.4 Mudanças estruturais	113
6.0 CONCLUSÕES	117
7.0 REFERÊNCIAS	119

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Septinas

Septinas constituem uma família de proteínas de ligação ao nucleotídeo de guanina que foram identificadas pela primeira vez, há mais de quarenta anos pelo pesquisador Hartwell (HARTWELL, 1971). Essas proteínas foram originalmente descobertas ao realizar uma análise genética em mutantes da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que apresentavam um fenótipo de incapacidade de completar o ciclo celular, sendo então nomeados de mutantes *CDC* (do inglês, *Cell Division Cycle*) (HARTWELL, L. H.; CULOTTI, J.; REID, 1970; HARTWELL et al., 1974).

Os estudos, realizados por Hartwell e colaboradores, revelaram que mutações em qualquer um dos genes *CDC3*, *CDC10*, *CDC11* e *CDC12* formavam células multinucleadas que não apresentavam as estruturas filamentosas localizadas no septo, as quais são necessárias para separar a célula mãe da célula filha, durante o brotamento em leveduras (BYERS, B.; GOETSCH, 1976) (Fig. 1A).

Posteriormente, os produtos destes genes foram identificados por microscopia de fluorescência na estrutura filamentosa de 10 nm formada no septo entre as células mãe e filha, promovendo a separação das mesmas (Fig. 1B) (HAARER; PRINGLE, 1987; HYONG BAI KIM, BRIAN K. HAARER, 1991; FIELD; KELLOGG, 1999; GLADFELTER; PRINGLE; LEW, 2001; WEIRICH; ERZBERGER; BARRAL, 2008). Essa nova família de proteínas passou então a ser chamadas de septinas, por sua participação na septação e divisão celular (LONGTINE et al., 1996).

Figura 1: Localização das septinas durante o ciclo celular. A) Septinas no estágio final do processo de divisão celular de *Saccharomyces cerevisiae*, visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão. As setas indicam a localização do anel no septo. Barra de 0,1 μm . B) Complexo em forma de anel contendo as septinas 2, 6, 7 de septinas humanas. Escala representada em 100 nm. C) Septinas durante a citocinese de *Saccharomyces cerevisiae*, visualizada por microscopia de fluorescência.

Fonte: A) Adaptada de BYERS; GOETSCH, 1976. B) Adaptada de KINOSHITA ET AL., 2002. C) Adaptada de GLADFELTER, PRINGLE e LEW, 2001.

As estruturas filamentosas de septinas chegaram a ser consideradas componentes únicos de leveduras, no entanto, mais adiante foram identificadas septinas em outros organismos eucariotos como fungos filamentosos, nemátodos, moscas e mamíferos, mas curiosamente nunca foi reportado septinas em plantas (DIDOMENICO et al., 1994; HARRIS, 1994; NAKATSUR, S.; SUDO, 1994; FIELD, 1996; MORI et al., 1996; KINOSHITA et al., 1997; NGUYEN et al., 2000).

A princípio, acreditava-se que as septinas pertenciam apenas a dois reinos, o *Fungi* e *Animalia*. No entanto, uma busca no banco de dados por sequências homólogas a de CDC3 de *Saccharomyces cerevisiae*, expandiu o grupo de organismos que possuem genes que codificam

septinas. A busca revelou a presença de septinas também nas algas verdes, marrom e protozoários ciliados (NISHIHAMA; ONISHI; PRINGLE, 2011).

A presença de septinas em grupos evolutivos distintos, sugere a existência de septinas em um ancestral comum que possuía um nível basal no grupo evolutivo dos eucariotos. Assim, acredita-se que ao longo da evolução alguns grupos perderam os genes de septinas, enquanto outras os proliferaram (NISHIHAMA; ONISHI; PRINGLE, 2011).

O número de genes de septinas é bastante variável para cada espécie, variando de 1 em alguns tipos de algas como *Chlamydomonas* (NISHIHAMA; ONISHI; PRINGLE, 2011) a 13 em humanos (ESTEY; KIM; TRIMBLE, 2011) (Tabela 1). Esse aumento do número de septinas em humanos pode estar relacionado a uma maior variabilidade funcional (HALL et al., 2005).

Tabela 1: Septinas em organismos modelos.

Organismo	Número de septinas	Nome
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1	SEP1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7	Cdc10; Cdc3; Cdc11; Cdc12; Shs1; Spr3; Spr28
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	7	Spn1; Spn2; Spn3; Spn4; Spn5; Spn6; Spn7
<i>Candida albicans</i>	7	Cdc3; Cdc10; Cdc11; Cdc12; Shs7; Spr3; Spr28
<i>Eremothecium gossypii</i>	7	Hyp1; Hyp2; Hyp3; Hyp4; Hyp5; Hyp6; Hyp7
<i>Aspergillus nidulans</i>	5	ASPA; ASPB; ASPC; ASPD; ASPE
<i>Neurospora crassa</i>	6	Hyp1; Hyp2; Hyp3; Hyp4; Hyp5; Hyp6
<i>Caenorhabditis elegans</i>	2	UNC-51; UNC-59
<i>Drosophila melanogaster</i>	5	SEP1; SEP2; SEP3; SEP4; <i>Pnut</i>
<i>Xenopus laevis</i>	2	Hyp1; SEPT2
Mamíferos	13	SEPT1; SEPT2; SEPT3; SEPT4; SEPT5; SEPT6; SEPT7; SEPT8; SEPT9; SEPT10; SEPT11; SEPT12; SEPT14

Fonte: Adaptada de (WEIRICH; ERZBERGER; BARRAL, 2008).

1.2 Domínios Estruturais e classificação das Septinas humanas

Estruturalmente todas as septinas apresentam um domínio amino terminal (N-terminal) variável, um domínio central de ligação a GTP (domínio G) e um domínio carboxi terminal variável (C-terminal) que em muitas septinas contém uma extensão predita para formar um *coiled coil* (HALL; RUSSELL; PRINGLE, 2008; BEISE; TRIMBLE, 2011) (Fig. 2A).

Os domínios N e C-terminal das septinas são os que mais divergem com relação ao tamanho e composição de aminoácidos. Em SEPT1, o N-terminal é constituído basicamente por 11 resíduos de aminoácidos, enquanto que em algumas variantes de SEPT9 o número de aminoácidos ultrapassa 260 (HALL; RUSSELL, 2004). Entre o domínio N-terminal e o domínio G existe uma região conservada em septinas, denominada região polibásica, a qual é diferenciada em septinas quanto a sua basicidade. Essa região é descrita ser responsável pela ligação a fosfolipídeos. Experimentos realizados com SEPT4, apontam a ligação específica dessa região da proteína a fosfolipídeos de membrana (PtdIns(4,5)P2 e fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato (PtdIns (3,4,5) p3), mostrando ainda, que mutações realizadas nessa região polibásica resultam na perda da interação (ZHANG et al., 1999). Pelo fato de SEPT2 e SEPT4 apresentarem a mesma sequência de aminoácidos nessa região polibásica, sugeriram especulações que SEPT2 também se ligasse aos fosfolipídeos de membranas (ZHANG et al., 1999b). A confirmação desta interação de SEPT2 com o fosfolipídeo PtdIns(4,5)P2, assim como visto para SEPT4, foi reportada pela primeira vez em trabalhos realizados no nosso grupo de pesquisa, utilizando a técnica de monocamadas fosfolipídicas de Langmuir (DAMALIO, 2011).

Dentre todos os domínios de septinas, o domínio de ligação a GTP é o mais conservado, e suas características funcionais e estruturais levam as septinas a serem classificadas como membros da superfamília das *P-loop* GTPases. Dentre as principais semelhanças dessa classe de proteínas, destacam-se a conservação do enovelamento baseado em uma arquitetura α - β - α e do sítio de ligação a GTP (WEIRICH; ERZBERGER; BARRAL, 2008).

Na extremidade do domínio G, existe uma região de 53 aminoácidos que contém uma sequência altamente conservada entre as septinas, denominada SUE (*Septin Unique Element*) (VERSELE M.; THORNER J., 2005). Uma análise com mais de 100 septinas mostrou que pelo menos a metade dos resíduos desta região são conservados (50-93%). No entanto, apesar dessa região ser altamente conservada, ainda não foi descrito uma função específica para a mesma,

porém, sabe-se que essa região é responsável pela formação de filamentos em septinas (HALL; RUSSELL; PRINGLE, 2008).

Como descrito anteriormente, o C-terminal variável das septinas é predito formar um *coiled coil*, o qual pode ser importante para mediar interação septina-septina e a septinas com outras proteínas (CASAMAYOR; SNYDER, 2003; VERSELE M.; THORNER J., 2005).

Quanto a nomenclatura das septinas, essa era bastante diversificada na época da sua descoberta, chegando a descrever a mesma septina com nomes diferentes, o que gerava bastante confusão. No entanto, em 2002 a nomenclatura das septinas foi unificada (MACARA, 2002; MARTINEZ, C.; WARE, 2004). A partir de então, as septinas humanas receberam a nomenclatura de SEPT1, SEPT2, SEPT3, e assim por diante, até a última septina conhecida (SEPT14). Os genes codificantes das septinas receberam a mesma nomenclatura só que escrito em itálico (*SEPT1*, *SEPT2*, *SEPT3*). Já as septinas que possuem isoformas, como é o caso da SEPT9 (7 isoformas), ao nome da septina é adicionado um traço seguido da letra “v” em minúsculo e o número da isoforma, por exemplo, SEPT9_v1.

As septinas humanas são compostas por 13 membros (SEPT1-SEPT12 e SEPT14), sendo que SEPT13, anteriormente identificada, foi considerada mais tarde como um produto de um pseudogene. No entanto, várias isoformas de septinas humanas são encontradas devido *splicing* alternativo (FÜCHTBAUER et al., 2011). As treze septinas humanas são divididas em 4 diferentes grupos de acordo com a identidade de sua sequência de aminoácidos: 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) (Fig. 2B) (MARTINEZ et al., 2006; MARTÍNEZ et al., 2004).

As septinas do Grupo II e IV, são as que apresentam um C-terminal mais longo, predito formar um *coiled coil*, as do Grupo III, apresentam um C-terminal mais curto, já as septinas que constituem o Grupo I, possuem um C-terminal curtíssimo e não possuem a região do *coiled coil* (Fig. 2B).

Figura 2: Organização estrutural das septinas humanas. A) Diagrama esquemático dos domínios de uma septina. Em preto está destacada a região polibásica, possível região de ligação a membrana plasmática e em cinza a região SUE (Elemento Único de Septina) e também a região *coiled-coil*. B) Classificação das septinas de mamíferos considerando seus domínios estruturais.

Fonte: A) Adaptada de (HALL; RUSSELL; PRINGLE, 2008) e B) Adaptada de (MACEDO, 2015).

1.3 Septinas e formação de filamentos

Septinas possuem a característica de se polimerizar formando complexos hetero-oligoméricos altamente organizados (*in vivo* e *in vitro*), que estão envolvidos em inúmeros processos biológicos. Embora sejam reportados a formação de filamentos fisiológicos a partir de uma única septina (MENDOZA; HYMAN; GLOTZER, 2002; HUANG et al., 2006), a maior parte dos filamentos são hetero-oligoméricos formados por duas ou mais septinas diferentes.

Em *Saccharomyces cerevisiae*, um hetero complexo é formado pelas septinas Cdc3, Cdc10, Cdc11 e Cdc12, organizados na forma de um octâmero contendo duas cópias de cada septina individual (FRAZIER et al., 1998; BERTIN et al., 2008). No caso do nemátodo *C. elegans* as duas cópias de septinas, UNC-59 e UNC-61, se organizam na forma de heterodímeros e heterotetrameros com igual número de subunidades de cada septina (JOHN et al., 2007). Complexo de septinas também foi isolado de *Drosophila melanogaster*, constituído pelas proteínas *Pnut*, SEPT1, SEPT2 (FIELD, 1996).

Recentemente, foram reportados heterofilamentos recombinantes em platelmintos, em *Schistosoma mansoni*. Neste, o heterocomplexo é formado pelas septinas *SmSEPT5/SEPT10/SEPT7.2*. Com relação a classificação de septinas em grupos, em *Schistosoma mansoni* não há nenhum representante do grupo I (SEPT3, SEPT9 e SEPT12), porém há uma duplicação da septina 7, denominadas 7.1 e 7.2 como descrito no complexo acima (ZERAİK et al., 2013).

Como descrito anteriormente, também há evidências de homofilamentos de septinas, porém ainda não está claro a sua função. Tal fato, gera dúvida se a formação desses homofilamentos é um fenômeno realmente fisiológico ou patológico. A primeira descrição de um homofilamento foi descrita para Sept2 de *Xenopus laevis*, onde foram observados homofilamentos dessa septina *in vitro* (MENDOZA; HYMAN; GLOTZER, 2002) (Fig. 3A). Já em septinas humanas foram observados homofilamentos em SEPT2 tanto na presença de GDP quanto GTP (HUANG et al., 2006a) (Fig. 3B) e também em SEPT4 (GARCIA et al., 2007) (Fig. 3C). Interessantemente, neste último caso, os autores sugerem que esses homofilamentos gerados por SEPT4 sejam do tipo amilóide e estejam relacionados a doenças degenerativas como mal de Parkinson e Alzheimer, uma vez que SEPT4 foi identificada em cérebro de pacientes com Alzheimer (HALL; RUSSELL; PRINGLE, 2008).

Figura 3: Homofilamentos de septinas. A) Sept2 de *Xenopus laevis* na presença de GTP γ S. Barra de 100 nm; B) SEPT2 humana na presença de GTP. Barra de 100 nm; C) SEPT4 humana na presença de GTP. Barra de 1000 nm.

Fonte: A) Adaptada de (MENDOZA; HYMAN; GLOTZER, 2002); B) Adaptada de (HUANG et al., 2006a) e C) Adaptada de (GARCIA et al., 2007).

1.4 Complexos de septinas humanas

A primeira e única estrutura cristalográfica de um complexo de septina, até o momento descrita, foi determinada em 2007 por Sirajuddin e colaboradores a uma resolução de 4 Å (FARKASOVSKY et al., 2005; SIRAJUDDIN et al., 2007). O complexo formado pelas septinas humanas SEPT2, SEPT6 e SEPT7 foi co-expressa em *E.coli* e os dados experimentais obtidos por cristalografia e microscopia eletrônica, permitiram deduzir a ordem em que as septinas se encontravam no filamento. Observou-se, que a unidade básica do complexo é um hexâmero que apresentou a seguinte disposição de subunidades: SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7 (Fig. 4). Este complexo que é apolar, passou então, a ser o modelo de estudo de formação de filamentos por septinas.

Figura 4: Estrutura do complexo formado pelas septinas humanas SEPT2-SEPT6-SEPT7. Aqui as interfaces de interação entre as septinas estão indicadas por NC e G. A vizinhança do hexâmero marca os contatos longitudinais utilizando a SEPT7 (em cinza). A posição e orientação dos domínios *coiled-coil*, estão indicados pelas setas pretas. A natureza dos nucleotídeos nas subunidades está indicada por GTP e GDP.

Fonte: Adaptada de (SIRAJUDDIN et al., 2007).

A estrutura cristalográfica do complexo revelou que a formação dos filamentos de septinas envolve basicamente interações conservadas entre o domínio de ligação a nucleotídeo. Dois tipos de interface se alternam ao longo do filamento, a chamada interface G (onde se encontra o sítio de ligação do nucleotídeo) e a interface NC formada por contatos envolvendo as regiões N- e C-terminais do domínio de ligação a GTP.

Esse complexo das septinas 2, 6 e 7 mostrou que as septinas preferem interagir com proteínas de grupos distintos (Fig. 4) para montar o heterofilamento. Além disso, o trabalho de Kinoshita (KINOSHITA, 2003) indica que sejam viáveis outras combinações de septinas na formação de um heterofilamento desde que em cada uma das três posições (ocupadas por SEPT2, SEPT6 e SEPT7 na estrutura acima) sejam feitas substituições apenas por outras septinas do mesmo grupo. Por exemplo, espera-se que a septina 2 possa ser substituída por septinas 1, 4 ou 5, todas pertencentes ao grupo III (Fig. 2). Já a septina 6 poderia ser substituída pelas septinas, 8, 10, 11 e 14. Com relação à septina 7, esta foi considerada uma septina chave, insubstituível. No entanto, o que não fica claro com relação a esse complexo é como as septinas do Grupo I (SEPT3, SEPT9 e SEPT12) fariam parte do mesmo.

Nos últimos anos, outros complexos de septinas foram descritos, porém com poucos detalhes e nenhum deles com informações estruturais de alta resolução. O complexo formado pelas septinas SEPT4-SEPT5-SEPT8 foi identificado utilizando a técnica de duplo híbrido em levedura (MARTÍNEZ et al., 2004a), assim como o complexo SEPT7-SEPT11-SEPT9b, caracterizado por imunofluorescência em fibroblastos embrionários de ratos (NAGATA et al., 2004). Já os complexos SEPT3-SEPT5-SEPT7 (FUJISHIMA et al., 2007; LUKOYANOVA; BALDWIN; TRINICK, 2008) e SEPT5-SEPT7-SEPT11 (XIE et al., 2007) foram identificados em tecidos nervosos, também isolados a partir de extratos de cérebro de ratos. Estudos recentes apontam que a SEPT9 faz parte do complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7 formando octâmeros, porém ainda não está clara sua disposição dentro do mesmo. Alguns autores sugerem que a SEPT9 ocupa uma posição terminal, obtendo um complexo octamérico organizado na seguinte sequência: SEPT9-SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9 (KIM et al., 2011; SANDROCK et al., 2011; SELLIN et al., 2011).

Apesar de várias combinações de septinas serem viáveis segundo as regras estabelecidas por Kinoshita (KINOSHITA, 2003), o que abre um campo de investigação desafiador, até o momento, a melhor descrição de complexos de septinas conhecida é referente ao complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7 a baixa resolução (4Å). Nesta estrutura a maior parte das cadeias laterais e vários loops estão faltando. Com isto, os detalhes em nível atômico, das interações entre subunidades e os fatores que controlam a montagem correta de um heterofilamento ainda não foram adequadamente descritos. Tampouco se sabe corretamente a respeito de uma explicação em nível molecular de porque algumas septinas se encontram complexadas com GDP e outras com GTP no contexto do heterofilamento. Estas lacunas no nosso conhecimento são todos resultados da falta de informações estruturais a alta resolução.

1.5 Septinas: funções e patologias

Embora as primeiras septinas tenham sido relacionadas a mutantes para o ciclo celular, hoje é evidente a participação das septinas em diversos processos como: reorganização do citoesqueleto (SURKA, 2002; NAGATA et al., 2003), determinação e manutenção da polaridade celular (DEMARINI et al., 1997; DREES et al., 2001; IRAZOQUI, 2004), dinâmica de membranas (FINGER; KOPISH; WHITE, 2003), tráfego de vesículas (HSU et al., 1998), exocitose (TRIMBLE et al., 1999), apoptose (ROBERTS et al., 2000), reparo de DNA e

estabilidade estrutural (IHARA et al., 2005; KISSEL et al., 2005; KREMER; ADANG; MACARA, 2007; KUO et al., 2015b).

No entanto, além do seu papel fisiológico, septinas também estão envolvidas em uma variedade de situações patológicas (KARTMANN; ROTH, 2001). Dentre as principais doenças as quais estão envolvidas, destacam-se o câncer e desordens neurológicas, tais como doença de Alzheimer e Parkinson (Tabela 2) (KINOSHITA et al., 1998; IHARA et al., 2003; PETERSON; PETTY, 2010).

Dentre os exemplos de septinas que estão relacionados a patologias tem-se a super expressão de SEPT1 em células escamosas de carcinoma oral, sugerindo sua participação na proliferação de câncer oral em alguma fase do processo (PETERSON; PETTY, 2010). No caso de SEPT1, SEPT2 e SEPT4, observou-se uma acumulação dessas septinas em estruturas citoplasmáticas patológicas comuns em doenças humanas neurológicas (KINOSHITA et al., 1998; GARCIA et al., 2006a). No mais, o gene de SEPT2 foi identificado como um parceiro fusionado de MML (mixed lineage leukemia) e em outros casos o domínio C-terminal dessa proteína foi identificado em pacientes com *lúpus* (MARGUTTI et al., 2005; CERVEIRA et al., 2006). Além disso, o gene dessa septina também tem sua expressão aumentada em vários tipos de tumores como cerebrais e meningiomas (KEIICHI SAKAI, MASANORI KURIMOTO, ATSUSHI TSUGU, SHERRI L. HUBBARD, WILLIAM S. TRIMBLE, 2002; CRAVEN et al., 2006). Na maioria dos casos reportados, a associação de septinas com neuroplasias, estão relacionadas com alterações no padrão de expressão dessas proteínas (YU, N. B.; DING, X. M.; CHEN, F.; SHEN, S. Q.; GU, X.; YU, 2000; BURROWS et al., 2003; KIM et al., 2004)

Tabela 2: Perfil de expressão de septinas e as patologias as quais estão relacionadas.

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

Fonte: Adaptada de (PETERSON; PETTY, 2010)

1.6 Septina 9 humana

De todas as septinas conhecidas até o momento, SEPT9 é a que está envolvida em um maior número de doenças. Essa septina é expressa ubiquamente em todos os tecidos, diferindo neste ponto de SEPT3 (do mesmo grupo) que é específica de tecido de cérebro (HALL et al., 2005b). Apesar de possuir um N-terminal extenso, essa septina é classificada no Grupo I (SEPT3, SEPT9 e SEPT12) devido à ausência da região *coiled-coil* (CAO et al., 2009).

Uma evidência, que veio a aumentar a importância de SEPT9 é a existência de filamentos de septinas baseados em unidades octaméricas, onde SEPT9 (Grupo I) pode interagir com SEPT7 nas extremidades do hexâmero SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7 através de uma interface G (Fig. 5) (KIM et al., 2011; SELLIN et al., 2011).

Figura 5: Modelo esquemático de complexos de septinas em hexâmeros e octâmeros. A) Heterocomplexo 2/6/7; B) Complexo canônico com a adição de SEPT9 na extremidade.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como apresentado no modelo acima, SEPT9 tem papel fundamental no processo de formação de polímeros baseados em octâmeros. Isso porque a interface fundamental para a polimerização é uma interface entre duas cópias de SEPT9 (SEPT3 ou SEPT12). A importância de SEPT9, assim como os demais representantes do grupo I, ainda não está clara, uma vez que não há nenhuma estrutura de heterocomplexo envolvendo-as.

Há também, estudos que reportam que SEPT9 pode contribuir para a formação de um complexo de septinas trimérico. Por meio de experimentos utilizando o sistema Y3H observou-se que SEPT9 pode substituir SEPT2, formando um trímero composto por SEPT9-SEPT6-SEPT7 (SANDROCK et al., 2011). Além disso, em um trabalho sobre interação entre septinas *in vivo* (NAKAHIRA et al., 2010), foram identificaram 96 clones mostrando a interação entre SEPT9 e SEPT6, o que sugere que SEPT9 poderia substituir SEPT2 no centro do complexo. Outro fato que poderia estar associado a essa hipótese é a falta do C-terminal em SEPT9, C-terminal esse que é reduzido em SEPT2, quando comparado com outras septinas (Fig. 2 B). No entanto, a existência desses complexos foge as regras estabelecidas por Kinoshita, onde apenas as septinas pertencentes ao Grupo III (SEPT1, SEPT4 e SEPT5) poderiam substituir SEPT2 que é o mesmo grupo.

Particularmente, dentre todas as septinas, SEPT9 é que possui maior número de isoformas. Através da técnica de sequenciamento, foi reportado que o *locus* genômico de SEPT9 é bastante complexo, podendo gerar até 47 transcritos, sendo que 34 codificam proteínas (MCILHATTON et al., 2001). Mais tarde, mostrou-se que os múltiplos transcritos gerados pelo *locus* de SEPT9, codificam sete isoformas (SEPT9_v1 – SEPT9_v7) (KALIKIN; SIMS; PETTY, 2000). Essas isoformas contêm as mesmas estruturas de uma septina comum: N- e C-terminal e domínio GTPase. Porém, observou-se que elas variam principalmente no domínio N-terminal (BURROWS et al., 2003a; SCOTT et al., 2005, 2006). Com relação a esse domínio, foi reportado que o mesmo possui motivos repetidos, constituídos de cargas positivas (K-R-X-X-E/ K-R-X-E) que interagem com regiões ácidas do C-terminal das β -tubulinas (BAI et al., 2013).

Até o momento, ainda não está esclarecida a razão biológica para a presença dos inúmeros transcritos de SEPT9. No entanto, estudos relacionados a análise de expressão dessa septina, demonstraram que essas isoformas tem expressão diferencial, podendo ter funções distintas em células diferentes de mamíferos (CONNOLLY et al., 2014).

Apesar dos avanços significativos feitos no campo de septinas ao longo dos últimos anos, o mecanismo pelo qual SEPT9 afeta diretamente uma variedade de funções celulares, estando envolvida em inúmeras patologias, ainda permanece desconhecido.

2.0 OBJETIVO

O objetivo deste projeto foi a obtenção dos complexos proteicos de septinas, assim como de septinas individuais, por técnicas de biologia molecular, onde os complexos melhor purificados foram utilizados para ensaios de cristalização e determinação estrutural. Os complexos de septinas produzidos de forma heteróloga foram utilizados para determinar fatores importantes para a formação de heterocomplexos e para investigar a validade das regras estabelecidas por Kinoshita no que diz respeito à substituição de septinas.

2.1 Objetivos específicos

- Subclonagem das sequências de DNA codificante das proteínas SEPT2, SEPT4, SEPT6, SEPT8, SEPT9 e SEPT11, e se necessário de algumas versões truncadas apropriadas para expressão e co-expressão em *E. coli*.
- Co-expressão em sistema heterólogo dos complexos proteicos SEPT4-SEPT6-SEPT7; SEPT4-SEPT8-SEPT7; SEPT9-SEPT11-SEPT7 e SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9.
- Purificação dos complexos e validação das interações *in vitro*.
- Expressão de SEPT9 e Caracterização biofísica da sua afinidade a nucleotídeos de guanina e de sua atividade GTPásica.
- Ensaios de cristalização dos complexos, assim como de SEPT9 individual.
- Difração de raios-X dos cristais e coleta de dados.
- Resolução e análise das estruturas cristalográficas.

3.0 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Complexos de septinas

3.1.1 - Clonagens das sequências codificadoras de SEPT2, SEPT4, SEPT6, SEPT9, SEPT11 e SEPT8 no plasmídeo de propagação, pGEM -T.

Com a finalidade de co-expressar em bactéria os complexos proteicos formados pelas septinas SEPT4-SEPT6-SEPT7, SEPT4-SEPT8-SEPT7, SEPT9-SEPT11-SEPT7 e SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9 foram sintetizados oligonucleotídeos específicos (*primers*) (Tabela 3) baseados nas sequências codificantes de SEPT2, SEPT4, SEPT6, SEPT8, SEPT9 e SEPT11. Tais oligonucleotídeos foram desenhados de acordo com a sequências depositadas no *GenBank*, sob os números de acesso NP_004395.1, NP_004565.1, NP_665798.1, NP_055961.1, AF123052.1 e NM_018243.2.

Tabela 3: Sequência de oligonucleotídeos utilizados para amplificar os DNAs alvos. Os sítios para reconhecimento das enzimas de restrição encontram-se destacados em azul.

Oligonucleotídeos	Enzimas de restrição	Sequências dos oligonucleotídeos 5'-3'
SEPT2NGC_Fw	<i>Nde I</i>	G <u>CATATG</u> TCTAAGCAACAGCCAAC
SEPT2NGC_Rv	<i>Xho I</i>	G <u>CTCGAG</u> TTACACGTGGTGCCCG
SEPT6NGC_Fw	<i>Nco I</i>	G <u>CCATGG</u> CAGCGACCGATATAG
SEPT6NGC_Rv	<i>Sal I</i>	C <u>GTCGACT</u> TAATTTTCTTCTCTTTGTC
SEPT9NGC_Fw	<i>Nde I</i>	G <u>CATATG</u> GAGAGGGACCGGATG
SEPT9NGC_Rv	<i>Xho I</i>	G <u>CTCGAG</u> TTACATCTCCGGGGCTTC
SEPT9GCα0_Fw	<i>Nde I</i>	G <u>CATATG</u> GGGATTGACTCCATCCTGG
SEPT9GCα0_Rv	<i>Xho I</i>	G <u>CTCGAG</u> TTACATCTCCGGGGCTTC
SEPT11F_Fw	<i>Nco I</i>	G <u>CCATGG</u> CCGTGGCGTGGGGA
SEPT11F_Rv	<i>Sal I</i>	C <u>GTCGACT</u> TATGTGAAGCTTGCATTTTCTTATCTTG
SEPT4_Fw	<i>Nde I</i>	G <u>CATATG</u> GACCGTTCACTGG
SEPT4_Rv	<i>Xho I</i>	G <u>CTCGAG</u> TTAATAGTTCTCCTTCATCT
SEPT8_Fw	<i>Nde I</i>	C <u>CATATG</u> GCGGCCACCGACCTGGAGCGCTTC
SEPT8_Rv	<i>Xho I</i>	C <u>CTCGAG</u> TTAGTTCTTCTTGTCTTGTCTTCCTCAG GGGCTGCTGCGAGG

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a amplificação dos cDNAs que codificam as proteínas de interesse, utilizou-se a *Reação em Cadeia da Polimerase- PCR*, em um termociclador PTC-100 (MJ Research INC), tendo como DNA molde plasmídeos recombinantes contendo as sequências codificadoras de SEPT2, SEPT6, SEPT9, SEPT11 e SEPT8, já existentes no Grupo de Biofísica Molecular do Instituto de Física de São Carlos - IFSC. Para a reação de amplificação por PCR, foi utilizado 70 ng de cDNA molde, 100 pmol de cada nucleotídeo, 0,2 mM dNTPs, 1U *High Fidelity PCR Enzyme Mix* (Fermentas), Tampão da enzima [10X] e água Milli-Q para um volume final de 50 μ L. O ciclo de amplificação foi realizado aquecendo as amostras a 94 °C por 2 minutos (desnaturação inicial), seguida de 25 ciclos: 94°C por 40 segundos (desnaturação das fitas), 54 °C por 30 segundos (hibridização dos oligonucleotídeos) e 72 °C por 1,5 minutos (extensão das fitas). Por fim, foi realizado ao final dos 25 ciclos uma extensão final por 5 minutos a 72 °C e em seguida a reação foi mantida a 4 °C até o início de procedimento de purificação do produto amplificado.

Os produtos amplificados foram analisados em geis de agarose 0.8% corados com brometo de etídio, para posterior visualização dos fragmentos de DNA através da luz ultravioleta. Em seguida os produtos amplificados por PCR foram purificados com o kit *Wizard SV gel and pCR clean-up system* (Promega), segundo as recomendações do fabricante. Os fragmentos de DNA purificados foram inseridos no vetor de propagação pGEM -T – *easy* (Promega) por meio de uma reação de ligação contendo 50 ng do produto de PCR, 20 ng do plasmídeo pGEM -T, 1 μ L da enzima T4 DNA Ligase (5U/ μ L) e água Milli-Q para um volume final de 10 μ L. A reação foi incubada por 16 h a 4 °C.

Transcorrido o tempo da reação de ligação, todo o volume da reação foi utilizado para transformação por choque térmico em células de *E. coli* DH5 α , competentes por tratamento com Cloreto de Cálcio.

Para a propagação dos plasmídeos recombinantes, o volume final de 10 μ L referentes a cada reação de ligação, foi misturado com células competentes e incubados por 30 minutos em gelo. Após esse tempo de incubação, os plasmídeos foram submetidos a um choque térmico: 2 min em um banho-maria a 42 °C e 3 min no gelo. Logo em seguida, adicionou-se a reação 200 μ L de meio de cultura Luria-Bertani (LB) que foi mantida sob agitação constante de 250 x g a 37 °C por 1 h. Em seguida, toda a reação foi plaqueada em meio LB ágar contendo 100 μ g/mL do antibiótico Ampicilina, 0,3 mM de IPTG (isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo) e 100 μ g/mL

de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosideo). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 16 h.

Após transformação em DH5 α , foram selecionadas algumas colônias de cor branca (clones positivos) as quais foram crescidas em meio LB líquido contendo ampicilina (50 μ g/mL) por 16 h a 37° C. Após esse tempo de incubação, o DNA plasmidial dessas células foi extraído por lise alcalina, fazendo uso do kit *Wizard Plus SV MiniPrep DNA Purification Systems* (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante.

Os plasmídeos recombinantes pGEM-T::SEPT2NGC, pGEM-T::SEPT6NGC, pGEM-T::SEPT9NGC, pGEM-T::SEPT9GC α 0, pGEM-T::SEPT4NGC, pGEM-T::SEPT8NGC e pGEM-T::SEPT11NGC foram submetidos a análise de restrição com suas respectivas enzimas de restrição (Tabela 3), para confirmação do inserto de interesse. As siglas NGC e GC α 0 correspondem respectivamente, a sequência codificadora da septina inteira e truncada. A reação de digestão foi montada com 2 μ g de DNA plasmidial, 1U de cada enzima, tampão 10x *FastDigest* e água Milli-Q para um volume final de reação de 50 μ L. As reações de clivagens foram incubadas em estufa a 37 °C por 4 h e posteriormente analisadas em gel de agarose 0.8%, corado com brometo de etídio.

A integridade dos plasmídeos recombinantes foram analisadas por um sequenciador automático ABI-Prism 3130xl (*Applied Biosystems*), utilizando o método de Sanger (SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, 1977). Os *primers* utilizados foram SP6 (*reverse*) e T73G (*forward*) para o vetor pGEM-T – *easy* (Promega).

3.1.2 - Subclonagem das sequências codificadoras de SEPT2, SEPT4, SEPT6, SEPT9, SEPT9GC α 0, SEPT11 e SEPT8 em plasmídeos do sistema pETDuet

A segunda etapa na produção dos plasmídeos recombinantes para co-expressão dos complexos de septinas, foi a transferência dos fragmentos de DNA dos plasmídeos recombinantes pGEM -T para os respectivos plasmídeos do sistema pETDuet (Novagen), que possuem duas regiões com sítios de múltipla clonagem, permitindo a inserção de dois genes em um mesmo plasmídeo. As sequências codificadoras de septinas foram clivadas dos plasmídeos recombinantes pGEM -T com as mesmas enzimas de restrição que os vetores do sistema Duet foram linearizados. A purificação dos produtos de digestão e as reações de ligação de cada

inserto no seu respectivo vetor, obedecendo a proporção de 1:3 (vetor : plasmídeo), foram realizadas seguindo o mesmo protocolo descrito no item 3.1.1.

As reações de ligação foram então usadas para transformar a linhagem DH5 α de *E. coli*, e colônias positivas foram selecionadas em meio de cultura LB ágar contendo antibiótico de seleção (ampicilina 50 μ g/ml para pETDuet, cloranfenicol 34 μ g/ml para pACYcDuet e canamicina 30 μ g/ml para pRSFDuet). Os clones positivos foram confirmados após extração do DNA plasmidial de colônias de bactérias transformantes, seguida de análise de restrição e eletroforese em gel de ágarose 0.8%. Os DNAs foram sequenciados para confirmar a integridade dos insertos. Para a inserção da segunda septina no plasmídeo de co-expressão do sistema Duet, realizou-se o mesmo procedimento descrito anteriormente.

Na tabela 4 estão descritos os plasmídeos recombinantes do sistema pETDuet obtidos após a inserção de uma ou duas sequências codificadoras de septinas.

Tabela 4: Combinações das septinas e plasmídeos utilizados na co-expressão dos complexos.

Septina	Plasmídeo	Endonuclease	Plasmídeo Recombinante
SEPT2NGC	pACYcDuet	<i>Nde I/Xho I</i>	pACYcDuet::SEPT2NGC
SEPT2NGC	pRSFDuet	<i>Nde I/Xho I</i>	pRSFDuet::SEPT2NGC
SEPT6NGC	pACYcDuet	<i>Nco I/Sal I</i>	pACYcDuet::SEPT6NGC
SEPT6NGC	pRSFDuet	<i>Nco I/Sal I</i>	pRSFDuet t::SEPT6NGC
SEPT4NGC	pETDuet- SEPT7NGC	<i>Nde I/Xho I</i>	pETDuet ::SEPT7- SEPT4NGC
SEPT4NGC	pACYcDuet	<i>Nde I/Xho I</i>	pACYcDuet::SEPT4NGC
SEPT4NGC	pRSFDuet	<i>Nde I/Xho I</i>	pRSFDuet t::SEPT4NGC
SEPT8NGC	pETDuet- SEPT7NGC	<i>Nde I/Xho I</i>	pETDuet ::SEPT7- SEPT8NGC
SEPT9NGC	pETDuet- SEPT7NGC	<i>Nde I/Xho I</i>	pETDuet ::SEPT7- SEPT9NGC
SEPT9GC α 0	pETDuet- SEPT7NGC	<i>Nde I/Xho I</i>	pETDuet ::SEPT7- SEPT9GC α 0
SEPT11NGC	pACYcDuet	<i>Nco I/Sal I</i>	pACYcDuet::SEPT11NGC

Fonte: Elaborada pela autora.

As clonagens foram realizadas de forma que apenas a SEPT7 fosse fusionada a sequência codificadora de seis resíduos de histidina, essa construção por sua vez, já se encontrava armazenada no banco de clones do Laboratório de Biofísica Molecular “*Sergio Mascarenhas*”.

3.1.3 Co - expressão dos complexos proteicos em *E. coli*.

As expressões dos complexos foram realizadas após a transformação da linhagem Rosetta ou BL21(DE3) de *E. coli* (Novagen) com os plasmídeos Duet recombinantes, conforme apresentado na Tabela 5. Ressaltando, porém, que o número de combinações não teve como objetivo o estudo de todas elas, mas sim, de escolher o complexo mais promissor.

Tabela 5: Combinação dos plasmídeos para co-expressão em *E. coli*.

Complexo de septinas	Plasmídeos recombinantes	Linhagem de <i>E. coli</i>
SEPT4NGC-SEPT6NGC-SEPT7NGC	pETDuet::SEPT7NGC-SEPT4NGC + pRSFDuet::SEPT6NGC	Rosetta
SEPT4NGC-SEPT6NGC-SEPT7NGC	pETDuet::SEPT7NGC-SEPT4NGC + pACYcDuet::SEPT6NGC	BL21(DE3)
SEPT4NGC-SEPT8NGC-SEPT7NGC	pETDuet::SEPT7NGC-SEPT8NGC + pRSFDuet::SEPT4NGC	Rosetta
SEPT4NGC-SEPT8NGC-SEPT7NGC	pETDuet::SEPT7NGC-SEPT8NGC + pACYcDuet::SEPT4NGC	BL21(DE3)
SEPT9NGC-SEPT11NGC-SEPT7NGC	pETDuet::SEPT7NGC-SEPT9NGC + pACYcDuet::SEPT11NGC	BL21(DE3)
SEPT2NGC-SEPT6NGC-SEPT7NGC - SEPT9NGC	pETDuet::SEPT7NGC-SEPT9NGC + pACYcDuet::SEPT2NGC-SEPT6NGC	BL21(DE3)
SEPT2NGC-SEPT6NGC-SEPT7NGC -SEPT9NGC	pETDuet::SEPT7NGC-SEPT9NGC + pRSFDuet::SEPT2NGC-SEPT6NGC	Rosetta
SEPT2NGC-SEPT6NGC-SEPT7NGC- SEPT9GCa0	pETDuet::SEPT7NGC- SEPT9GCa0 + pACYcDuet::SEPT2NGC-SEPT6NGC	BL21(DE3)
SEPT2NGC-SEPT6NGC-SEPT7NGC- SEPT9GCa0	pETDuet::SEPT7NGC- SEPT9GCa0 + pRSFDuet::SEPT2NGC-SEPT6NGC	Rosetta

Fonte: Elaborada pela autora.

A seleção das colônias foi realizada em meio de cultura LB contendo 50 µg/ml de ampicilina, 30 µg/ml de canamicina e 34 µg/ml de cloranfenicol para células Rosetta ou contendo apenas ampicilina e cloranfenicol nas mesmas concentrações para BL21(DE3). Uma colônia isolada de *E. coli* carregando os plasmídeos recombinantes Duet foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo os antibióticos de seleção e em seguida foi incubada por 14 horas a 37 °C e agitação de 250 x g. O inóculo foi transferido para 1L de meio TB contendo os antibióticos de seleção, sendo incubado a 37 °C, sob agitação de 250 x g, até atingir DO_{600nm} de 0,8. Em seguida, as células foram incubadas a temperatura de 24 °C por aproximadamente 1 hora e então induzidas por adição de 0,4 mM de IPTG, seguido de incubação por 15 horas, a 24 °C e 250 x g.

Após o tempo de incubação, as células foram coletadas por centrifugação a 6.000 x g por 20 minutos a 4 °C, e finalmente ressuspensas em 20 ml de tampão (25 mM tampão fosfato de sódio pH 7,8, 8% glicerol, 300 mM NaCl, 50 mM de ácido glutâmico, 50 mM de ácido arginina e 5 mM MgCl₂). A suspensão celular foi armazenada a -80 °C até a realização da purificação.

3.1.4 Purificação dos complexos proteicos

Inicialmente as células foram descongeladas no banho de gelo e rompidas por sonicação: 15 ciclos de 25 segundos com intervalos de 35 segundos. A fração insolúvel (*pellet*) foi então separada da fração solúvel por centrifugação a 14.000 x g durante 30 minutos, a 4 °C. A fração solúvel foi aplicada em coluna de cromatografia contendo 3 mL de resina Talon metal affinity resin, previamente equilibrada com 20 mL de tampão A (25 mM tampão fosfato de sódio pH 7,8, 8% glicerol, 300 mM NaCl, 50 mM de ácido glutâmico, 50 mM de L - arginina e 5 mM MgCl₂). Em seguida a resina passou por duas etapas de lavagem para retirar possíveis contaminantes. A primeira lavagem consistiu de 50 mL de tampão A com 0,1% de Triton X-100 e a segunda lavagem foi feita com 50 mL de tampão A com 5 mM de imidazol. Por fim, o complexo proteico foi eluído em 8 mL de tampão A contendo 300 mM de imidazol. Após essa etapa de purificação as amostras da lavagem e da eluição foram analisadas em gel SDS-PAGE 15%. A fração contendo o complexo foi então concentrada em *Millipore* de 30 kDa até um volume final de 2,5 mL.

A etapa seguinte no processo de purificação do complexo, consistiu em uma cromatografia de exclusão molecular, realizada em coluna Superdex 200 acoplada ao sistema

AKTA purifier (GE Healthcare). Alíquotas de 1 mL do complexo concentrado foram aplicadas na coluna previamente equilibrada com tampão B (20 mM Hepes, pH 8,0, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM de ácido glutâmico, 50 mM de ácido arginina e 5 mM DTT). O fluxo utilizado foi de 0,5 mL/min, monitorado pela absorbância em 280 nm. O material eluído foi coletado em frações de 1 mL e a integridade dessas amostras foi analisada por SDS-PAGE 12%.

3.1.5 Espectrometria de massa

A identificação das proteínas que compõem o complexo SEPT2NGC-SEPT6NGC-SEPT7NGC-SEP9GCα0 foi realizada por espectrometria de massa. Amostras do complexo purificado por cromatografia de exclusão molecular foram desnaturados para separar as bandas por SDS-PAGE 12%, corado com *Comassie Blue* durante 1h e em seguida descorado com água. As bandas correspondentes as proteínas de interesse foram isoladas, fragmentadas e armazenadas em micro tubo separados.

As amostras foram submetidas a sucessivas lavagens com 100 mM de NH₄HCO₃ (bicarbonato de amônio) e 50% de ACN, afim de remover todo o *Comassie Blue* e o SDS. Em seguida as bandas foram desidratadas com 100% de acetonitrila durante 5 min e o excesso de ACN foi eliminado em um *Speed vac* durante 3 minutos. Ao gel desidratado foi adicionado uma solução contendo 50 mM de bicarbonato e 0,5 µg de tripsina. A reação foi incubada no gelo por 30 min.

Em seguida, foi adicionado volume suficiente de 50 mM de bicarbonato de amônio para cobrir o gel e finalmente a mistura foi incubados por 16 horas a 37 °C. Após o tempo de incubação, a reação de digestão foi interrompida por adição de 10 µL de ácido fórmico (5%) seguido de incubação a temperatura ambiente por 10 minutos e de transferência do sobrenadante para outro microtubo. Ao gel foi adicionado 5% de ácido fórmico em 50% de ACN, novamente em volume suficiente para cobri-lo. A mistura foi incubada durante 10 minutos a 25 °C e o sobrenadante foi transferido para o microtubo contendo a amostra do passo anterior. Esta etapa foi repetida mais uma vez, finalizando o procedimento com a redução do volume final da amostra para 100 µL em um *Speed vac*.

A identidade das proteínas foi averiguada por análises de LC-MS/MS em um espectrômetro de massa *ESI-microTOF-Q II 10234* (Bruker Daltonics). Os dados foram

analisados no programa MASCOT disponível no endereço eletrônico http://www.matrixscience.com/search_form_select.html, com o auxílio do Dr. Edson Crusca.

3.1.6 Ensaios de cristalização dos complexos de septinas

Cristalografia por difração de raio X, é a principal técnica para resolução de estruturas tridimensionais de proteínas e outras macromoléculas biológicas. A partir do padrão de difração de raio X do cristal proteico, é possível obter um mapa de densidade eletrônica da macromolécula em estudo. No entanto, é fundamental que ocorra a cristalização da proteína, que consiste basicamente na diminuição da solubilidade da mesma, de forma gradual e ordenada, para que ocorra a nucleação dos cristais seguida de seu crescimento (MCPHERSON, 2009; GIACOVAZZO et al., 2012).

Triagens iniciais de cristalização foram realizados com os complexos SEPT2NGC-SEPT6NGC-SEPT7NGC-SEPT9GC α 0 e com o heterodímero SEPT7NGC- SEPT9GC α 0, utilizando-se o método de difusão de vapor *sitting drop* (gotas sentadas) (BRANDEN, C et al 1991). Nesse método ocorre uma difusão de vapor entre a gota sentada e a solução do reservatório, obtendo como resultado, o aumento gradativo da concentração da amostra até se atingir o ponto de supersaturação e nucleação. A partir de então, tem-se cristais de proteínas devido ao crescimento desses núcleos (Fig. 6).

Figura 6: Métodos de cristalização de proteínas. Em A está representado o método de *Hanging drop* (gota suspensa) e em B o método de *Sitting drop* (gota sentada). A solução do reservatório (solução de cristalização) é diluída na proteína inicialmente a uma proporção de volume 1:1. Uma vez, que a solução de cristalização se encontra mais concentrada, ocorre uma difusão de vapor entre a gota suspensa ou sentada para o reservatório. Como resultado desse processo, a proteína vai sendo concentrada gradativamente.

Fonte: Adaptada de (MATSUYAMA, 2016)

A princípio os primeiros testes foram realizados variando a concentração do complexo em 1,5, 2,5 e 3,5 mg/mL. As condições utilizadas nos experimentos foram as fornecidas pelos kits *Morfeus*; MIDAS, PEGs e PEGs II suíte, AmSo4 suit e Cryos suit, todos adquiridos da empresa Qiagen. A temperatura de incubação foi de 4 °C.

3.2 CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA E ESTRUTURAL DE SEPT9GC

3.2.1 Clonagem e Expressão de SEPT9GC α 0 e SEPT9GC

Para a amplificação da sequência codificadora correspondente a SEPT9GC (resíduos 279-568), que incluiu o domínio G e C sem a região polibásica (α 0) que antecede o domínio G, utilizou-se a técnica da *Reação em Cadeia da Polimerase* - PCR, em um termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.) tendo como molde o clone inicial de SEPT9GC α 0 (resíduos 262-568) previamente clonado no vetor de propagação pGEM-T *easy* (Promega). Para isso foram sintetizados *primers* baseados na sequência, que flanqueavam as regiões codificantes (Tabela 6).

Tabela 6: Sequência de oligonucleotídeos utilizados para amplificar o cDNAs de SEPT9GC. Os sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição encontram-se destacados em azul.

Oligonucleotídeos	Enzimas de Restrição	Sequência dos oligonucleotídeos 5'-3'
SEPT9GC_Fw	<i>Nde I</i>	G <u>CATATG</u> TTTCGAGTTCAACATCATGGTGGTCG
SEPT9GC_Rv	<i>Xho I</i>	G <u>CTCGAG</u> TTACATCTCCGGGGCTTC

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a amplificação de SEPT9GC, 30 ng do plasmídeo recombinante pGEM-T::SEPT9GC α 0 foi utilizado como molde com 0,2 μ M de cada oligonucleotídeo flanqueador (Tabela 6). Os reagentes e as condições de reação foram as mesmas descritas no item 3.1.1. O produto da amplificação foi purificado, inserido no vetor pGEM-T- *easy* e sequenciado para confirmação da clonagem como descrito anteriormente.

Após verificação da integridade dos plasmídeos recombinantes pGEM-T::SEPT9GC α 0 e pGEM-T::SEPT9GC, os mesmos foram submetidos a digestão exaustiva com as enzimas *Nde I* e *Xho I*. O DNA liberado do vetor foi purificado para posterior subclonagem no vetor de expressão pET28a(+), previamente linearizado com as mesmas enzimas de restrição. As reações de ligação, foram feitas como descrito no item 3.1.1, utilizando a razão de 1:3 de vetor

: fragmento. Os clones foram confirmados novamente por análise de restrição e sequenciamento do DNA utilizando os oligonucleotídeos T7 promotor e T7 terminador apropriados para o vetor pET28a(+). Os plasmídeos recombinantes pET28::SEPT9GC α 0 e pET28-T::SEPT9GC foram utilizados para transformação em células de *E. coli* Rosetta. As colônias recombinantes foram selecionadas em meio LB ágar contendo os antibióticos de seleção canamicina (50 μ g/mL) e cloranfenicol (34 μ g/mL).

3.2.2 Expressão de SEPT9GC α 0 e SEPT9GC

Uma colônia isolada de *E. coli* Rosetta pET28::SEPT9GC α 0 ou pET28::SEPT9GC foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo 50 μ g/mL de canamicina e 34 μ g/mL de cloranfenicol e mantida sob agitação durante 16 horas a 37 °C. O inóculo foi diluído na proporção 1:100, em um volume de 500 mL de meio LB contendo os mesmos antibióticos. As células foram crescidas, sob agitação constante, a 37 °C até atingir a D.O._{600nm} entre 0,4 e 0,6. Após atingir a densidade óptica, a cultura foi mantida a 22 °C por 1 h. Em seguida a expressão da proteína foi induzida pela adição de IPTG para uma concentração final de 0,2 mM e incubação durante 16 h a 22 °C e 250 x g. A verificação da expressão das proteínas foi feita por análise em SDS-PAGE 12%.

As células foram coletadas por centrifugação a 10000 x g por 30 minutos a 4 °C e submetidas ao teste de solubilidade. Para isso, as células foram ressuspensas em 20 mL de tampão Tris 25 mM, pH 7,8, NaCl 300 mM, MgCl₂ 5 mM e Glicerol 12%. As células foram armazenadas a -80 até o início da purificação.

3.2.3 Purificação das proteínas SEPT9GC α 0 e SEPT9GC

As células foram descongeladas e lisadas por ultrassonicação em um sonicador Sonifier 250 (Branson) por meio de 7 pulsos de 20 segundos com intervalos de 30 segundos. As frações solúveis e insolúveis foram separadas por centrifugação (30 minutos a 13000 x g, 4 °C) e analisadas por SDS-PAGE 12%.

A fração solúvel foi aplicada em coluna de afinidade contendo 2 mL da resina TALON (BIOSCIENCE, 2003), previamente equilibrada com 5 volumes de tampão A (Tris 25 mM, NaCl 300 mM, MgCl₂ 5 mM, Glicerol 12%, pH 7,8), esse passo foi repetido mais de uma vez.

Em seguida a resina foi lavada com 10 volumes de tampão A com 15 mM de Imidazol para eliminar os contaminantes. A eluição das proteínas de interesse foi realizada em 8 mL de tampão A com 150 mM de imidazol. As amostras foram concentradas até 3,0 mg/mL em um concentrador *Millipore* de 30 kDa. Em todas as etapas foram armazenadas alíquotas das soluções para análise em SDS-PAGE 12%.

A segunda etapa no processo de purificação de SEPT9GC α 0 e SEPT9GC recombinante foi a cromatografia de exclusão molecular, que neste caso utilizou-se para separar agregados proteicos das proteínas na forma nativa. Alíquotas de 1 mL das proteínas previamente purificadas por cromatografia de afinidade foram aplicadas na coluna Superdex 200 (HR 10/30, GE Healthcare), pré-equilibrada com tampão (Hepes 20 mM, NaCl 300 mM, MgCl₂ 5mM, β -mercaptoetanol 5 mM e 12% de Glicerol, pH 7,8) e acoplada a um sistema Äkta purifier (GE Healthcare). A corrida foi realizada a um fluxo de 0,5 mL/min, monitorada pela absorbância a 280 nm. Alíquotas de 1 mL foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE 12%.

A determinação da concentração de cada proteína, foi realizada por medidas de absorbância a 280 nm, com base no coeficiente de extinção molar calculado a partir da sequência de aminoácidos das proteínas, fazendo uso do programa ProtParam (GASTEIGER E., HOOGLAND C., GATTIKER A., DUVAUD S., WILKINS M.R., APPEL R.D., 2005)

3.2.4 Determinação da massa molecular aparente de SEPT9GC

A cromatografia de exclusão molecular permite a obtenção da MM aparente da proteína SEPT9GC, através do volume de eluição de cada proteína. Para isso, foi usada a coluna *Superdex 200 GL 10/300* (Amersham Biosciences) acoplada ao sistema de FPLC, utilizando o equipamento *AKTA Purifier* (GE). O padrão de proteínas utilizado continha as proteínas: ferritina (440 kDa), aldolase (158 kDa), conalbumina (75 kDa), ovalbumina (44 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e ribonuclease (13,7 kDa). O Blue Dextran 2000 a 1 mg/mL foi utilizado como padrão para determinar o volume de exclusão da coluna.

A partir do tratamento dos dados da cromatografia de exclusão molecular analítica, utilizando os valores correspondentes ao volume de eluição das proteínas-padrão e da proteína-alvo é possível determinar a MM aparente assim como o K_{av} . O tratamento é descrito abaixo:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad \text{Equação 1}$$

Onde V_e é o volume de eluição de cada proteína, V_0 é o volume da fase móvel e V_t é o volume de coluna total. O K_{av} está relacionado ao log da MM pela equação apresentada abaixo. Com isso, foi construído um gráfico e do ajuste linear é possível determinar a MM aparente segundo a equação:

$$K_{av} = -a(\log MM_{ap}) + b \quad \text{Equação 2}$$

Em que a é o coeficiente angular da reta, MM é a massa molecular e b é o coeficiente linear da reta.

3.2.5 Dicroísmo Circular

Espectroscopia de dicroísmo circular – CD, foi usada como ferramenta para avaliar a estrutura secundária da proteína SEPT9GC e também verificar se esta sofre modificações induzidas pela interação com os nucleotídeos GTP γ S e/ou GDP.

As análises de CD foram realizadas com amostras da proteína a uma concentração de 7,5 μ M em um espectropolarímetro Jasco J815 *CD Spectrometer* (Tóquio, Japão), conectado a um sistema de controle de temperatura (*Peltier*) nas dependências do Laboratório de Biofísica. As amostras foram adicionadas em uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho óptico e os espectros foram coletados em uma faixa de comprimento de onda de 190 a 280 nm, a temperatura de 20°C e uma média foi obtida a partir de três varreduras, para cada espectro. Espectros de CD no tampão (Fosfato de Sódio 10 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM e Glicerol 12%; pH 7,8) foram subtraídos dos espectros originais da proteína.

Para investigar a influência dos nucleotídeos GDP e GTP γ S na estrutura secundária de SEPT9GC, a proteína foi incubada com 22,5 μ M de GDP ou GTP γ S na proporção 1:3 (proteína : nucleotídeo) e os espectros foram coletados nas mesmas condições descritas acima.

Os valores obtidos na leitura de CD (mdeg) foram convertidos para elipticidade molar residual (ERM) (Equação 3) definida por:

$$ERM = (\theta \times MM) / (c \times l \times n) \quad \text{Equação 3}$$

Onde θ é a elipticidade em graus (Deg), MM é a massa molecular da proteína (g/mol), c é a concentração da proteína (mg/mL). L é o comprimento do caminho óptico (cm) e n é o número de resíduos de aminoácidos da proteína.

Para estimar o conteúdo de estrutura secundária de SEPT9GC, os espectros finais foram analisados utilizando o pacote de desconvolução CDPRO (SREERAMA; WOODY, 2000), fazendo uso dos programas Selcon3, Contill e CDSSTR (COMPTON; JOHNSON, 1986; YANG; WU; MARTINEZ, 1986; SREERAMA; VENYAMINOV; WOODY, 2008).

3.2.6 Análise do teor de nucleotídeo e da atividade GTPásica de SEPT9GC

Para análise do teor de nucleotídeo de SEPT9GC as amostras foram preparadas segundo o método descrito por Seckler (SECKLER, R.; WU, G. M.; TIMASHEFF, 1990).

Inicialmente adicionou-se 250 μ L de ácido hipercloreto (HClO_4) gelado a uma concentração de 1,5 M em 500 μ L de SEPT9GC a 20 μ M para que ocorresse a desnaturação da proteína e liberação do nucleotídeo. A amostra foi então, incubada no gelo durante 10 min e as proteínas desnaturadas foram removidas por centrifugação durante 10 min, a 16.000 x g a uma temperatura de 4 °C. Afim de precipitar o KClO_4 e neutralizar o pH, 600 μ L do sobrenadante foram transferidos para outro microtubo e adicionou-se a essa solução 100 μ L de K_2HPO_4 1 M, 100 μ L de KOH 3 M e 80 μ L de ácido acético 5 M, gelados. A amostra foi congelada a 20 °C por 2 h e em seguida descongelada, centrifugada (10 min, 16.000 x g, 4 °C) e uma alíquota de 200 μ L foi retirada para análise.

Para o teste de atividade GTPase, foi preparada uma reação de 20 mL de SEPT9GC a 20 μ M, a qual foi incubada com um excesso de GTP na proporção 3:1 (nucleotídeo: proteína). A amostra foi mantida a 20 °C e a coleta de alíquotas se deu em dois passos: No primeiro passo foram retiradas alíquotas da reação a cada 5 min durante uma hora e no segundo passo foram retiradas alíquotas a cada 20 min durante 4 h seguinte. As alíquotas foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido para parar a possível reação de hidrólise do GTP.

As amostras foram descongeladas, centrifugadas (15 min, 16.000 x g, 4 °C) e analisadas em uma coluna de troca aniônica *Protein Pack DEAE 5 PW*, 7,5 mm x 7,5 cm (Waters) acoplada a um sistema de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Os tampões utilizados na cromatografia foram tampão A (Tris 25 mM, pH 7,8) e tampão B (Tris 25 mM, pH 7,8 com

NaCl 1M). A solução tampão da proteína tratada com HClO_4 foi utilizada como controle. Foi também realizada uma curva padrão de GTP (200 μM) e GDP (300 μM) diluídos no mesmo tampão da proteína e submetidos ao mesmo tratamento com HClO_4 . A cromatografia foi realizada a 25 °C e monitorada pela absorbância em 253 nm.

3.2.7 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

A técnica de calorimetria de titulação isotérmica, foi usada para avaliar a ligação de SEPT9GC aos nucleotídeos de guanina GDP e a um análogo não hidrolisado do GTP, o GTPyS (guanosina 5'-[tiofosfato]). Avaliou-se também por essa técnica, a influência do cofator (Mg^{2+}) na ligação dos nucleotídeos de guanina.

As medidas foram realizadas em um microcalorímetro VP-ITC (MicroCal). Na cela da amostra de 1,417 mL foram colocados SEPT9GC a 24 μM ou a solução tampão Fosfato 20 mM, NaCl 300 mM, MgCl_2 5 mM, Glicerol 12%, pH 7,8. Os ligantes GDP e GTPyS (Qiagen) foram preparados na solução tampão da proteína para uma concentração final de 3 mM e 0,8 mM respectivamente, e foram utilizados em uma seringa de alta pressão. Realizou-se 45 injeções de 8 μL para o GTPyS e 5 μL para o GDP com intervalos de 240 segundos entre as injeções. O calor de diluição foi determinado pela titulação do ligante na solução tampão, sob as mesmas condições descritas anteriormente. Todo o procedimento foi realizado a temperatura de 18 °C e sob agitação de 255 x g. A ligação entre o reagente (SEPT9GC) e os ligantes (GDP ou GTPyS) resultou na liberação ou absorção de calor ao longo do tempo, o qual foi registrado na forma de uma curva de titulação analisada com o programa ORIGIN para ITC (MicroCal), obtendo-se uma isoterma de titulação.

Para a análise do cofator (Mg^{2+}), foi utilizado o mesmo protocolo descrito acima, com mudança apenas no tampão, ao qual não continha MgCl_2 e foi suplementado com 1 mM de EDTA.

Todos os reagentes e solução tampão passaram por uma desgaseificação durante 10 min, para evitar a formação de bolhas durante o experimento. Todo o procedimento foi realizado conforme recomendações do fabricante do equipamento, microcalorímetro VP-ITC (MicroCal).

3.2.8 Co-cristalização de SEPT9GC

As triagens iniciais de cristalização da SEPT9GC foram realizados automaticamente pelo uso do robô de cristalização *Honeybee* (Genominc Solutions Inc), com *kits* de 96 condições em uma placa de gota sentada, com três poços por condição. Os *kits* utilizados nos experimentos foram: Classics suite, PEGs suite e Cryos suite, todos adquiridos da empresa (Qiagen). Além destes, foram utilizados os *kits crystal screen HT* e *salt RX HT* da Hampton e também os *kits* Morpheus, Midas e JCSG da Molecular Dimensions.

Utilizando o método de difusão de vapor, *sitting drop*, gotas de 1 µL da solução contendo, 4,2 mg/mL de SEPT9GC apo, com adição de 1,5 mM de GDP em tampão 20 mM de Hepes, pH 7,5, 300 mM de NaCl, 5mM de MgCl₂, 12% de Glicerol e 5mM de β-mercaptoetanol, foram misturadas a 1 µL da solução do poço. Para esses ensaios robóticos, o volume de solução precipitante no poço foi de 80 µL e dentre as soluções testadas, a solução composta por PEG 1500 24% e Glicerol 20% do kit JCSG, foi a única que possibilitou crescimento de cristais que resultaram nas estruturas obtidas. Na Tabela 7, está apresentada todos os *kits* e algumas das condições para co-cristalização de SEPT9GC com os nucleotídeos GDP, GTPγS e GppNHP.

Tabela 7: Ensaios robóticos de cristalização para SEPT9GC. Volume da amostra : volume da solução precipitante (1 : 1). A condição de cristalização de SEPT9GC está destacada em verde.

	Forma <i>apo</i> (2,5 mg/mL) Com <i>His-tag</i> *	Forma <i>apo</i> (4,2 mg/mL)	Forma <i>apo</i> (6,0 mg/mL)	Com GDP (2,5 mg/mL)	Com GDP (4,2 mg/mL)	Com GDP (6,0 mg/mL)	Com GTP γ S (2,5 mg/mL)	Com GTP γ S (4,2 mg/mL)	Com GTP γ S (6,0 mg/mL)	Com GMPPNP (2,5 mg/mL)	Com GMPPNP (4,2 mg/mL)	Com GMPPNP (6,0 mg/mL)
<i>crystal screen HT</i>												
<i>salt RX HT</i>												
Classics suite												
PEGs suite												
Cryos suite												
Morpheus												
JCSG					1 μ l : 1 μ l							
Midas												

Fonte: Elaborada pela autora.

Para essa condição que apresentou cristais na etapa automática, foram realizados ensaios manuais de forma a refinar a condição inicial. Nesta etapa algumas otimizações como, pequenas variação de pH, concentração de precipitante e/ou proteína foram realizadas. Para este refinamento utilizou-se placas de gotas suspensas, *hanging drop*, com lamínulas siliconizadas (Fig. 6A). O volume de solução precipitante no poço foi de 800 µl e a proporção de proteína *versus* solução precipitante foi de 1 : 1 e de 1 : 2. Em todos os casos, as placas foram armazenadas em câmara fria a 18 °C e em menos de 24 h houve formação de cristais de SEPT9GC-GDP que foram congelados em nitrogênio líquido.

3.2.9 Soaking

Ensaio de co-cristalização de SEPT9GC feitos com os nucleotídeos GTPγS e GppNHP (análogos não hidrolizável de GTP) não resultaram em cristais da proteína. No entanto, os resultados referentes a interação de SEPT9GC com os nucleotídeos de guanina, feitas por Calorimetria de Titulação- ITC, mostraram que SEPT9GC possui uma afinidade por GTPγS maior que por GDP. Assim, baseando-se nesses resultados, além dos experimentos de co-cristalização de SEPT9GC-GDP, experimentos de *soaking*, também foram realizados afim de observar a troca do nucleotídeo GDP por GTPγS a qual a proteína SEPT9GC tem mais afinidade.

Para realizar os experimento de *soaking*, foram utilizados os melhores cristais de SEPT9GC complexado a GDP. Os cristais selecionados foram incubados *overnight* em 7 µL da mesma solução de cristalização de SEPT9GC-GDP descrita no item 3.2.8, entretanto, foi adicionado a essa solução 7 mM de GTPγS. Transcorrido o tempo de incubação, os cristais foram montados em *cryoloops*, congelados em nitrogênio líquido e armazenados adequadamente para coleta. Foi utilizado o método de difusão de vapor *sitting drop* para os ensaios de *soaking*.

3.2.10 Coleta de dados e resolução da estrutura

Três conjuntos de dados, foram coletados com sucesso. Destes conjuntos, dois foram de SEPT9GC-GDP, sendo que um foi coletado no Laboratório de Biologia Estrutural IFSC-USP e o outro no *SOLEIL Synchrotron* (Saint Aubin–França). O terceiro conjunto de dados foi também obtido no *SOLEIL Synchrotron* (Saint Aubin–França) com cristais de SEPT9GC-GTPγS. Os dados foram integrados e escalonados com o programa *XDS* (KABSCH, 2010). A

estrutura foi resolvida por substituição molecular implementado no programa *Phaser* (MCCOY et al., 2007) do pacote *Phenix*. Para o primeiro conjunto de dados foi utilizado o modelo de SEPT3-GC (PDB 3SOP), já para os outros dois conjuntos de dados, utilizou-se as coordenadas previamente refinadas de SEPT9GC-GDP (PDB 4YQF). Após a substituição molecular, a estrutura foi submetida a ciclos de refinamento utilizando-se o programa *phenix.refine* e *Coot* (EMSLEY; COWTAN, 2004) e as figuras foram geradas pelo programa PyMOL (DELANO, 2013).

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Amplificação e clonagem dos cDNAs que codificam as proteínas alvo do projeto

Os DNAs alvo das septinas foram amplificados com sucesso por meio da reação em cadeia da polimerase e visualizados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, apresentando uma banda de amplificação do tamanho esperado para cada septina (Fig. 7).

Figura 7: Amplificação dos cDNAs de interesse. Marcador) Padrão de pares de base 1kb DNA Ladder (Fermentas). A - Insetos referentes a SEPT4NGC (~1437 pb), SEPT6NGC (~1284 pb), SEPT9NGC (~1707 pb) e SEPT8NGC (~1287 pb); B - Insetos referentes a SEPT11NGC (~1480 pb) e SEPT2NGC (~1086 pb) e C - Inseto referente a SEPT9GCα0 (~921 pb).

Fonte: Elaborada pela autora.

Os produtos referentes às amplificações das septinas foram cuidadosamente isolados do gel de agarose, purificados, inseridos no vetor de propagação pGEM T *Easy* vector e sequenciados. Após a confirmação da clonagem por análise de restrição e sequenciamento, os genes foram subclonados nos vetores de expressão do sistema pETDuet. A sequência codificadora da septina SEPT7 apenas foi inserida de forma a ser produzida fusionada no N-terminal à sequência codificadora para seis resíduos de histidinas no plasmídeo pETDuet. SEPT9, SEPT8 e SEPT4 foram inseridas no mesmo plasmídeo sem fusão. Por fim, as sequências que codificam SEPT6, SEPT2 e SEPT11 foram inseridas no plasmídeo pACYcDuet e/ou pRSFDuet, também livres de fusão.

A confirmação das clonagens foi realizada por digestão dos plasmídeos recombinantes com enzimas de restrição específicas (Tabela 3). Após a digestão, os plasmídeos liberaram as bandas referentes aos fragmentos de interesse, confirmando a subclonagem em vetor de expressão satisfatoriamente (Fig. 8).

Figura 8: Confirmação dos clones recombinantes por análise de restrição. 1) Padrão de pares de base 1 kb DNA Ladder (Fermentas). 2: plasmídeo recombinante pRSF::SEPT4 clivado com *Nde* I e *Xho* I, 3: plasmídeo recombinante pACYC::SEPT6 clivado com *Nco* I e *Sal* I, 4: plasmídeo recombinante pRSF::SEPT2 clivado com *Nde* I e *Xho* I, 5: plasmídeo recombinante pETDuet::SEPT9 clivado com *Nde* I e *Xho* I, 6: plasmídeo recombinante pACYC::SEPT11 clivado com *Nco* I e *Sal* I, 7: plasmídeo recombinante pETDuet::SEPT8 clivado com *Nde* I e *Xho* I e 8: plasmídeo recombinante pETDuet::SEPT9 α 0 clivado com *Nde* I e *Xhe* I.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Expressão, solubilidade e purificação dos complexos proteicos

O objetivo principal desse projeto foi a coexpressão de complexos proteicos de septinas, uma vez que se acredita que muitas das dificuldades em se trabalhar com estas moléculas individualmente é decorrente do fato de que, nas células, essas moléculas devam estar interagindo entre si, resultando assim na formação de heterofilamentos. Este fato importante foi confirmado pelos vários complexos identificados a partir de células e também pelo “interactoma de septinas”, onde ficou evidente a preferência das septinas para interagirem com outras septinas, normalmente pertencentes a outros grupos (SIRAJUDDIN;FARKASOVSKY et al., 2007; NAKAHIRA;MACEDO et al., 2010).

Através de dados do duplo híbrido realizados no IFSC-LNBio coordenado pelo professor Jorg Kobarg, foi montado um mapa que permitiu confirmar a preferência das septinas para interagir com septinas pertencentes a outros grupos, indo de acordo com as regras de Kinoshita. Baseando-se nestes dados, foram escolhidos como alvo do presente estudo os complexos SEPT4-SEPT6-SEPT7; SEPT4-SEPT8-SEPT7; SEPT9-SEPT11-SEPT7 e SEPT2-SEPT6-SEPT9-SEPT7. As combinações para alguns destes complexos foram baseadas nas regras de substituição estabelecidas por Kinoshita. As regras de Kinoshita dizem que dentro do complexo formado por SEPT2-SEPT6-SEPT7 cada posição destas proteínas poderá ser substituída por outra septina pertencente ao mesmo grupo. De fato, a montagem destes heterofilamentos não se resume apenas a uma simples substituição de septinas dentro de um complexo já conhecido, porém a obtenção de estruturas de outros complexos de septinas se torna uma estratégia interessante de estudo, uma vez que pode esclarecer se realmente há um padrão seguido na montagem dessas estruturas. Assim, os complexos SEPT4-SEPT6-SEPT7 e SEPT4-SEPT8-SEPT7 escolhidos para este trabalho, apresentam uma e duas substituições, respectivamente. No complexo SEPT4-SEPT6-SEPT7 (Fig. 9C) a SEPT4 está substituindo a SEPT2 e no complexo SEPT4-SEPT8-SEPT7 além da substituição da SEPT4 pela SEPT2, ocorrerá também à troca da SEPT6 pela SEPT8 (Fig. 9D).

A multiplicidade de genes de septinas em mamíferos sugerem que complexos de septinas com composições diferentes de SEPT2-SEPT6-SEPT7 são susceptíveis de existir. Neste contexto, foi escolhido também para estudo o complexo formado por quatro septinas, SEPT2-SEPT6-SEPT7- SEPT9 (Fig. 9B). Até o momento a melhor descrição de complexos de septinas é referente ao complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7 (Fig. 9A) os quais se apresentaram na forma de hexâmeros. No entanto, estudos recentes apontam que a SEPT9 faz parte deste

complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7 formando octâmeros, porém ainda não está clara sua disposição dentro do mesmo. Alguns autores sugerem que a SEPT9 ocupa uma posição terminal, obtendo um complexo octamérico organizado na seguinte sequência: SEPT9-SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9 (MOSHE S. KIM, 2011; SANDROCK; INGRID et al., 2011, NAKAHIRA; MACEDO et al., 2010)

O último complexo escolhido para estudo foi o complexo formado por SEPT9-SEPT11-SEPT7 (Fig. 9E), o qual já foi descrito na literatura (NAGATA; ASANO et al., 2004). Nesse caso, ocorrem duas substituições, a substituição de SEPT2 por SEPT9 e SEPT11 por SEPT6 que são homólogas. Esse caso não se encaixa perfeitamente nas regras de Kinoshita, já que SEPT2 e SEPT9 não pertencem ao mesmo grupo, porém essa substituição mantém proteínas de grupos diferentes no complexo. Além disso, em um trabalho anterior sobre interação entre septinas *in vivo*, foram identificados 96 clones mostrando a interação entre SEPT9 e SEPT6, o que sugere que SEPT9 poderia substituir SEPT2 no centro do complexo. Outro fato que poderia estar associado a essa hipótese é a falta do C-terminal em SEPT9, C-terminal esse que é reduzido em SEPT2, quando comparado com outras septinas (Figura 2).

Figura 9: Modelos de organização das septinas nos complexos: **A)** Complexo canônico 2/6/7. **B)** Complexo canônico 2/6/7 com a adição da SEPT9 na extremidade. **C)** Complexo 4/6/7 com SEPT4 substituindo SEPT2. **D)** Complexo 4/8/7 com SEPT4 substituindo SEPT2 e SEPT8 substituindo SEPT6. **E)** Complexo 9/11/7 com a possibilidade de SEPT9 substituir SEPT2 e SEPT11 substituir SEPT6 pertencentes ao mesmo grupo. **F)** Complexo 9/11/7 no caso de um octâmero, onde haveria duas cópias de SEPT9 para apenas uma cópia das outras septinas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Todos os complexos propostos nesse projeto foram submetidos a testes de co-expressão e solubilidade, sendo que foi selecionado para dar continuidade aos experimentos, aquele que apresentou melhor nível de expressão e homogeneidade entre as proteínas após purificação.

Dentre os testes de co-expressão realizados para os complexos SEPT7NGC-SEPT4NGC-SEPT6NGC e SEPT7NGC-SEPT8NGC-SEPT4NGC observou-se baixos níveis de expressão de SEPT4NGC (dados não mostrados). Já com relação ao complexo SEPT7NGC-SEPT9NGC-SEPT11NGC, tanto SEPT9NGC quanto SEPT11NGC não apresentaram níveis de expressão (dados não mostrados).

Mediante a dificuldade de obter a versão de SEPT9NGC, optou-se por uma versão truncada da mesma. A estrutura de SEPT2 (PDB 2QA5) (SIRAJUDDIN et al., 2009) que possui o $\alpha 0$ no início da cadeia, foi usada como base para definir onde começaria a cadeia da

versão truncada de SEPT9, a qual se iniciou também a partir da hélice “ $\alpha 0$ ”, que contém uma região polibásica de ligação a fosfolipídios e também contribui para interações via interface NC em homo e heterofilamentos de septinas. Essa nova construção de SEPT9, denominada SEPT9GC $\alpha 0$ (resíduos 262-568) foi subclonada tanto no pETDuet para co-expressão do complexo SEPT2NGC-SEPT6NGC-SEPT7NGC-SEPT9GC $\alpha 0$, quanto no pET28a(+) para estudos de caracterização estrutural.

4.2.1 Complexo 2/6/7/9GC $\alpha 0$

Mediante os resultados apresentados para os complexos citados no item anterior, optou-se por dedicar maiores esforços no trabalho com o complexo 2/6/7/9GC $\alpha 0$.

A princípio foram feitos testes de expressão separadamente das construções SEPT2NGC-SEPT6NGC::pRSF e SEPT7NGC-SEPT9GC $\alpha 0$::pETDuet para avaliar o nível de expressão das proteínas antes de realizar testes de co-expressão do complexo. As induções feitas na célula hospedeira *E. coli* Rosetta (DE3) a 28 °C por 16h, 250 x g e 0,3 mM de IPTG resultaram na expressão das proteínas de maneira solúvel, como pode ser visualizado em SDS-PAGE 12%, onde visualiza-se as bandas referentes ao tamanho esperado das proteínas (Fig. 10).

Figura 10: SDS-PAGE 12% contendo amostras das proteínas SEPT2NGC, SEPT6NGC, SEPT7NGC e SEPT9GC $\alpha 0$. Marcador: MM Page Ruler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas). A) Expressão das proteínas SEPT2NGC (41 kDa) e SEPT6NGC (49 kDa). B) Expressão das proteínas SEPT7NGC (50 kDa) e SEPT9GC $\alpha 0$ (34 kDa).

Fonte: Elaborada pela autora.

Como apresentado na Figura 10, a expressão de SEPT2, SEPT6, SEPT7 e SEPT9GC α 0 de forma solúvel era um bom indício, uma vez que, pode indicar interação entre as duas proteínas. Ressaltando ainda, que septinas expressas isoladamente nem sempre se apresentam de forma solúvel.

Assim, foi possível a co-expressão do complexo tetramérico SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9GC α 0. Os plasmídeos recombinantes SEPT2-SEPT6::pRSF e SEPT7-SEPT9GC α 0::pETDuet foram utilizados para a co-expressão, utilizando o mesmo protocolo usado para expressar as proteínas em plasmídeos separados (28 °C por 16 h, 250 x g e 0,4 mM de IPTG).

A co-expressão das quatro septinas foi realizada com sucesso (Fig. 11, canaleta 1), o que nos permitiu partir para o processo de purificação. A purificação do complexo proteico foi realizada em duas etapas cromatográficas, sendo a primeira uma cromatografia de afinidade a metal (Co²⁺), devido a presença da cauda de seis resíduos de histidina na extremidade amino-terminal de SEPT7NGC. A purificação resultou na recuperação de uma amostra com cinco proteínas (Fig. 11, canaleta 4), o que nos intrigou.

Figura 11: SDS-PAGE 12% contendo amostras do complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEP9GC α 0 após cromatografia de afinidade ao cobalto. *MM* - MM Page Ruler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas). 1 - Fração solúvel do extrato proteico; 2 - Proteínas que não ligaram a resina de afinidade; 3 - Corresponde a lavagem da resina com 15 mM de imidazol e 4 - Corresponde a frações de proteínas eluídas da resina na presença de 300 mM de imidazol.

Fonte: Elaborada pela autora.

Baseando-se nas massas moleculares das proteínas esperava-se a presença de apenas três bandas no gel. A primeira banda (superior) corresponderia a SEPT7 (50 kDa) e SEPT6 (49 kDa) que apresentam massas moleculares similares e se sobrepõem no gel. A segunda e terceira banda no gel seria correspondente a SEPT2 (41 kDa) e SEP9GC α 0 (34 kDa) respectivamente, as quais apresentam massa molecular diferentes, sendo assim, visualizadas no gel como bandas distintas.

No entanto, observou-se que entre as bandas correspondentes a uma mistura de SEPT7, SEPT6 e SEPT2, foi co-eluída uma quarta proteína, o que gerou dúvidas, se a composição proteica do complexo correspondia ao que era esperado.

Assim, com o intuito de confirmar se as bandas presentes no gel eram referentes a SEPT2NGC, SEPT6NGC, SEPT7NGC e SEPT9GC α 0, análises de espectrometria de massa foram realizadas com as amostras extraídas do gel de poliacrilamida. As quatro bandas visualizadas no gel foram recortadas separadamente e tripsinizadas conforme protocolo descrito no item 3.1.5. A análise por espectrometria de massa dos peptídeos permitiu mapear a estrutura primária das proteínas com coberturas entre 9 e 49% (Apêndice 1).

Os resultados obtidos por espectrometria de massas revelaram que a banda 1 no gel de poliacrilamida correspondia a SEPT6 e SEPT7, na banda 2 a proteína identificada foi SEPT7 também, na terceira a SEPT2 estava presente, e na última banda, como esperado SEPT9GC α 0 foi identificada (Apêndice A). Os resultados ainda mostram que a segunda banda do gel (Fig. 11, canaleta 4), provavelmente corresponde a uma degradação de SEPT7, uma vez que não foi identificado nenhum peptídeo no C-terminal da sequência da proteína (Apêndice A2). Em contrapartida, na primeira banda do gel (Fig. 11) que também corresponde a SEPT7, foi possível identificar peptídeos na sua estrutura que cobria desde o domínio C-terminal até o domínio N-terminal.

Esses dados estão de acordo com aqueles já apresentados na literatura por Siraijudin, no relato da estrutura do complexo de septinas formado por SEPT2-SEPT6-SEPT7. Ele descreveu em sua tese de doutorado que também observou a presença de uma proteína a mais na co-purificação das proteínas presentes no complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7. Esta proteína também foi identificada como SEPT7 (SEPT7-d) na ausência de parte do domínio C-terminal indicando que durante o processo de expressão e/ou purificação do complexo ocorria degradação de SEPT7. Além disso, o autor reportou em sua tese, que apesar da degradação, ele continuou

trabalhando com a construção contendo a SEPT7 inteira, pois a presença de SEPT7-d em nada afetou a obtenção dos cristais do complexo.

Assim, após confirmação da composição do complexo por espectrometria de massas, foi realizada uma cromatografia de gel filtração analítica para avaliar o perfil de eluição do complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9 α 0. Como apresentado na Figura 12, o perfil de eluição do complexo foi comparado com a proteína Ferritina (440 kDa) que possui uma massa molecular conhecida, sendo assim, usada como um padrão. Observou-se que o complexo tetramérico saiu antes da ferritina, o que é compatível com o formato esperado de complexo.

Figura 12: Purificação do complexo formado pelas septinas humanas 2/6/7/9. Cromatografia de exclusão molecular do complexo — 2/6/7/9 realizada em coluna Superdex 200 usando um dispositivo AKTA sob um fluxo de 0,5 mL/min e fracionamento de 0,5 mL. O volume de exclusão da coluna foi determinado usando — Blue Dextran e a amostra de — Ferritina foi usada para comparação com o complexo. O pico 1 corresponde a agregados proteicos e saiu no volume de exclusão da coluna, o pico 2 corresponde ao complexo 2/6/7/9.

Fonte: Elaborada pela autora.

As amostras foram coletadas e analisadas em SDS-PAGE 12% (Fig. 13).

Figura 13: Análise de SDS-PAGE 12 % das amostras do complexo 2/6/7/9 após cromatografia de exclusão molecular. A - M) Marcador de massa molecular; 1 – Fração referente ao pico 1 (Void) e de 2-4 - Frações referentes ao segundo pico que corresponde as proteínas que incluíram na coluna. B- Amostra concentrada das frações 2-4 referente ao pico 2.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como observado na Figura 13, o complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9 eluiu numa posição semelhante à da proteína Ferritina (440 kDa). O complexo tetramérico SEPT2 (41 kDa) - SEPT6 (49 kDa) - SEPT7 (50 kDa) - SEPT9 α 0 (34 kDa) apresenta uma massa molecular total de ~174 kDa, no entanto o resultado sugere que a amostra do complexo é constituída por estruturas que podem possuir massa molecular superior à aquela esperada para um tetrâmero. Tal fato, sugere que o hetero-complexo purificado esteja na forma octamérica o que levaria a uma massa molecular de ~ 448 kDa.

Vários protocolos de purificação foram testados com o complexo 2/6/7/9, afim de obter uma amostra homogênea, equimolar e a uma concentração suficiente para realizar os ensaios de cristalização, porém sem sucesso até o momento. Nesse sentido, com o intuito de obter os reagentes equimolares em solução, foi construído pela Dr. Joci Neuby Macedo durante seu pós doutorado no grupo, um vetor denominado MBPTDuet, onde o His-TAG do vetor pRSFDuet é substituído pela MBP. No caso do complexo 2/6/7/9, a estratégia de clonagem se deu de forma que a MBP ficasse fusionada a SEPT2, para permitir que o complexo de septinas passe por dois passos de purificação por afinidade, o primeiro por afinidade ao cobalto (His-TAG pelo cobalto) e um segundo em uma resina de amilose (MBP pela amilose). Esse novo complexo com a MBP fusionada a SEPT2NGC, também será empregado para ensaios de microscopia eletrônica com o complexo 2/6/7/9, afim de investigar tanto a posição das septinas quanto a formação de octâmeros. Além disso, visando

evitar a degradação da SEPT7, uma nova construção foi feita, onde 57 aminoácidos do C-terminal da SEPT7 que degradavam foram retirados, baseando-se nos resultados de massas obtidos e também nos dados reportados por Siraijudin (SIRAJUDDIN, 2007). Essa nova construção foi denominada SEPT7NGc.

4.2.2 Complexo SEPT7NGc- SEPT9GCα0

Mediante as dificuldades em obter amostras do complexo 2/6/7/9 para ensaios de cristalização, optou-se por trabalhar com o heterodímero 7/9, visando estudar interações da interface G. Testes de co-expressão do heterodímero 7/9 com a nova construção de SEPT7 (denominada SEPT7NGc) foram realizados visando observar se havia a recuperação das duas proteínas após purificação, uma vez que foi retirado parte do C-terminal de SEPT7. No entanto, espera-se que em nada altere o perfil de expressão das proteínas 7/9, pois tais proteínas que compõem esse heterodímero interagem via interface G e não através de contato com o C-terminal de SEPT7.

A indução do complexo SEPT7NGc-SEPT9GCα0::pETDuet foi feita em *E. coli* Rosetta (DE3) a 28 °C por 16h, 250 x g e 0,3 mM de IPTG, e resultou na expressão das proteínas, as quais foram identificadas na fração de proteínas solúveis. Na Figura 14 observa-se a presença das duas proteínas com tamanho esperado, SEPT7NGc (44 kDa) e SEPT9GCα0 (34 kDa).

Figura 14: SDS-PAGE 12% contendo amostra do heterodímero SEPT7NGc-SEP9GCα0 após cromatografia de afinidade ao Co^{2+} . M) Padrão de massa molecular: MM PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas); 1) Fração das proteínas solúveis; 2) Fração das proteínas que não ligaram na resina de cobalto; 3) Lavagem da coluna com tampão contendo 7 mM de imidazol; 4) Eluição do complexo com 250 mM de Imidazol; 5) Eluição do complexo com 500 mM e 6) Eluição do complexo com 1 M de Imidazol.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como se pode observar na figura 14, a purificação resultou na recuperação de uma amostra com duas proteínas equimolares e homogênea. Isso é um forte indício de que no caso de SEPT7 e SEPT9 a porção C-terminal de SEPT7 não participa da interação que estabiliza este heterodímero. Observa-se ainda na figura 14, a ausência da banda extra correspondente a versão degradada de SEPT7, indicando que realmente a degradação de SEPT7 está relacionada a esta porção do C-terminal.

Assim, as frações obtidas após esta etapa de purificação por afinidade, foram separadas para realizar a segunda etapa de purificação através de cromatografia de exclusão molecular, afim de avaliar o perfil de eluição do heterodímero. (Fig. 15).

Figura 15: Cromatografia de exclusão molecular do complexo SEPT7NGc-SEP9GC α 0 e análise por SDS-PAGE 12%. A) Cromatografia de exclusão molecular do heterodímero — SEPT7NGc-SEP9 α 0 realizada em coluna Superdex 200. Perfil cromatográfico dos padrões utilizados juntamente com o complexo: — Blue Dextran usado para determinar o volume de exclusão da coluna; — Perfil cromatográfico dos padrões Aldolase (158 kDa), Ovalbumina (44 kDa) e Ribonuclease (13,7 kDa). B) Análise do heterodímero após cromatografia de exclusão molecular em SDS-PAGE 12%; M - Padrão de massa molecular *PageRuler™ Unstained Protein Ladder* (Fermentas); 1 – Amostra de 7NGc-9GC α 0 concentrada aplicada na coluna de exclusão molecular; 2 e 3 - frações referentes ao pico 1 que saíram no *void* da coluna; 4, 5 e 6 - frações referentes ao pico 2 que correspondem a amostras do heterodímero que incluiu na coluna; 7 - fração referente ao pico 3 que corresponde a um excesso de SEPT9GC α 0.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como observado na figura 15, o complexo SEPT7NG-SEPT9 α 0 que teria uma massa molecular de 78 kDa na forma dimérica, apresenta perfil cromatográfico semelhante ao da proteína Aldolase (158 kDa), a qual possui massa molecular similar a esperada para um tetrâmero, formado por duas unidades de cada septina. Comportamento esse que já foi visto para o complexo 2/6/7/9 e descrito na literatura (SIRAJUDDIN et al., 2007), o que torna esse resultado mais uma evidência que as unidades dos heterocomplexos são formados por duas cópias de cada septina.

As frações (4-6) do complexo foram reunidas, concentradas em um concentrador Amicon Ultra 30k (*Millipore*), quantificadas para uso em ensaios de cristalização.

Os ensaios de cristalização até o momento não resultaram em cristais do complexo, no entanto, mais ensaios precisam ser realizados, afim de encontrar uma condição ideal para cristalização do complexo uma vez que o mesmo se apresenta estável em solução, o que o torna um complexo bastante promissor para cristalização.

4.3 Clonagem e expressão de SEPT9GC

Mediante as dificuldades em cristalizar os complexos completos e/ou parciais, optou-se por trabalhar com SEPT9 isolada. A relevância em estudar SEPT9 isolada, está no fato da mesma formar uma interface fisiológica com ela mesma, conforme o modelo canônico, denominada interface NC.

Procurando obter a proteína SEPT9 de forma solúvel e estável para os ensaios de caracterização biofísica e estrutural, optou-se inicialmente por construções da proteína truncada, uma vez que o N-terminal dessa proteína é predito ser desordenado, como apresentado na Fig. 16.

Figura 16: Mapa da estrutura secundária de SEPT9. O programa PSIPRED foi usado para prever a estrutura secundária de SEPT9 com os parâmetros padrões do programa. Características correspondentes as previsões são codificadas por cores onde as regiões coloridas em rosa (■) corresponde as hélices, as coloridas em amarelo (■) correspondem as fitas e as regiões não coloridas correspondem a estruturas desordenadas e/ou regiões de conexão (*loops*) das estruturas secundárias. Os domínios de SEPT9 encontram-se divididos em quatro caixas coloridas, onde: cinza corresponde ao N-terminal da proteína, verde a sequência de aminoácidos que corresponde a hélice α 0, vermelho ao domínio GTPase e azul ao C-terminal da proteína.

Fonte: Elaborada pela autora.

Baseando-se na sequência de aminoácidos, os estudos de SEPT9 se iniciaram com uma construção da proteína a qual incluía uma região que continha uma hélice alfa zero (α 0) como já descrito anteriormente, denominada SEPT9GC α 0 (resíduos 262-568). A proteína foi expressa de forma solúvel, porém a mesma apresentou-se bastante instável em solução, e precipitava a baixas concentrações, o que veio a dificultar os vários testes de cristalização realizados com essa proteína. Como SEPT9GC α 0 precipitava em concentrações superiores a 3 mg/mL, os testes de cristalização foram realizados com a proteína a uma concentração que variava de 1,0 a 2,5 mg/mL. No entanto, não foi possível obter cristais da proteína, acredita-se que a hélice α 0 seja bastante flexível o que veio a dificultar a cristalização da proteína.

Baseando-se nesses dados, optou-se então, por uma nova construção de SEPT9 onde os aminoácidos referentes a hélice α 0 foram retirados, obtendo-se uma nova versão truncada de proteína denominada SEPT9GC (resíduos 279-568). A confirmação da clonagem dessa proteína foi realizada por sequenciamento e digestão do plasmídeo recombinante, o qual liberou a banda referente ao fragmento de interesse de 870 pb, confirmando a subclonagem em vetor de expressão satisfatoriamente (Fig. 17).

Figura 17: Clivagem do plasmídeo recombinante SEPT9GC::pET28a(+). MM) Padrão de massa molecular 1kb DNA *Ladder* (Fermentas). As demais canaletas representam o plasmídeo recombinante clivado com *Nde* I e *Xho* I liberando o inserto de interesse.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após análise de restrição e sequenciamento do plasmídeo, a indução da proteína SEPT9GC foi feita em *E. coli* Rosetta (DE3) a 22 °C por 16 h, 250 x g e 0,2 mM de IPTG resultando na expressão da proteína de maneira solúvel, como pode ser visualizado na foto do SDS-PAGE 12% (Fig. 18), no qual destaca-se uma banda robusta que mostra a banda referente ao tamanho esperado da proteína SEPT9GC (~34 kDa).

Figura 18: SDS-PAGE 12% contendo amostra da SEP9GC após cromatografia de afinidade ao Cobalto. M) Padrão de massa molecular: MM *PageRuler™ Unstained Protein Ladder* (Fermentas); 1) Fração solúvel da proteína; 2) Fração solúvel de proteínas que não ligou na coluna; 3) Lavagem da coluna com tampão contendo 15 mM de Imidazol e 0,1 % de detergente; 4) Eluição de SEP9GC com 50 mM de Imidazol; 5) Eluição de SEP9GC com 250 mM de Imidazol; 6) Eluição de SEP9GC com 500 mM de Imidazol; 7) Eluição de SEP9GC com 700 mM de Imidazol e 8) Eluição de SEP9GC com 1 M de Imidazol.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como se pode observar a proteína SEPT9GC foi obtida basicamente quando eluída com 50 mM e 250 mM de Imidazol. Essas proteínas foram então submetidas a uma cromatografia de exclusão molecular, com a finalidade de avaliar seu perfil de eluição, avaliando assim, se a amostra se encontra homogênea em relação ao conteúdo de formas oligoméricas (Fig. 19).

Figura 19: Perfil cromatográfica de SEPT9GC (34 kDa) e SEPT9GC α 0 (37 kDa) em coluna Superdex 200 acoplada ao AKTA Purifier. Tampão Tris-NaCl 25 mM, NaCl 300 mM, MgCl₂ 5 mM, Glicerol 12% e β -mercaptoetanol 5 mM; pH 7,8. A) Perfil cromatográfico de SEPT9GC; B) Comparação do perfil cromatográfico de — SEPT9GC e — SEPT9GC α 0.

Fonte: Elaborada pela autora.

O resultado da cromatografia de SEPT9GC (Fig. 17A), mostra a presença de um único pico bem definido (~16 mL), característica essa de uma amostra homogênea o que sugeri a existência de um único estado para SEPT9GC. Tal perfil cromatográfico é semelhante àquele visto para SEPT3 que eluiu na forma de monômero que é classificada no mesmo grupo da SEPT9 (Grupo I) (MACEDO et al., 2013).

4.3.1 Determinação da massa molecular de SEPT9GC

A partir do perfil de eluição de SEPT9GC e da curva de calibração montada a partir do perfil cromatográfico de proteínas com massas moleculares conhecidas, foi possível determinar a MM aparente de SEPT9GC. Toda a análise foi realizada em uma coluna Superdex 200 GL10/300 acoplada ao ÄKTA FPLC (GE Healthcare). A coluna foi calibrada com seis proteínas padrão e a partir dos volumes de eluição obtidos, foi montada uma curva de

calibração, permitindo assim, calcular a MM aparente de SEPT9GC (Fig. 20A). A massa molecular aparente calculada foi estimada em aproximadamente 43 kDa, sendo que a MM teórica calculada a partir da estrutura primária de SEPT9GC foi de aproximadamente 34 kDa.

Figura 20: Estimativa da MM aparente de SEPT9GC utilizando cromatografia de exclusão molecular. A) Curva de calibração das proteínas padrões obtidos a partir da regressão linear dos volumes de eluição, inferindo a localização da SEPT9GC na reta. B) Perfis cromatográficos dos padrões juntamente com SEPT9GC: — aldolase (158 kDa), ovalbumina (44 kDa), ribonuclease (13,7 kDa); — Conalbumina (75 kDa) e Anidrase Carbônica (29 kDa); — Ferritina (440 kDa); — SEPT9GC e — Blue Dextran foi utilizado para determinar o valor de exclusão da coluna.

Fonte: Elaborada pela autora.

Há de se ressaltar que nesta metodologia utiliza-se como padrões proteínas globulares, logo a determinação da MM de uma amostra proteica será mais precisa, se esta amostra for composta também por uma proteína globular. Mas esta característica da metodologia, não a invalida para ser aplicada a amostra em que a proteína possua uma forma não globular. Experimentalmente, isso implica em diferenças na MM estimada por meio de gel filtração analítica, quando comparada com o MM real do sistema proteico. Essa diferença na massa geralmente é consequência da forma assimétrica da proteína, o que contribui com o grau de retenção da mesma na coluna. No entanto, apesar da diferença este resultado é compatível com a proteína no estado monomérico, assim como visto para SEPT3 (MACEDO, 2015). Podemos então inferir, que além da característica estrutural de ausência de *coiled coil*, as septinas do grupo I (a qual tanto SEPT9 quanto SEPT3 pertencem) também apresentam a forma monomérica em solução (MACEDO, 2015).

4.3.2 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

Os espectros de CD no UV-distante da proteína SEPT9GC foram obtidos em solução aquosa. Nesta região, é possível monitorar as transições eletrônicas da ligação peptídica que se estabelece entre os resíduos de aminoácidos da proteína. Tais transições oferecem informações sobre a estrutura secundária global de SEPT9GC.

O espectro de CD de SEPT9GC em solução aquosa apresentou bandas de absorção com posicionamento característico de uma proteína que contém estruturas em hélice- α , o que é evidenciado pela presença dos dois mínimos em 208 e 222 nm e máximo positivo em 192 nm (Fig. 21A), um indicativo de que a proteína está enovelada.

Figura 21: Espectros de CD de SEPT9GC. A) Espectro de CD de SEPT9GC (7,5 μ M) a 20 °C em tampão Fosfato de Sódio 10 mM, NaCl 50 mM, Glicerol 5% e $MgCl_2$ 5 mM; pH 7,8. B) Comparação dos espectros de CD da proteína SEPT9GC (7,5 μ M) quando ligada a GDP e/ou GTP γ S (22,5 μ M).

Fonte: Elaborada pela autora.

Espectros de CD muito semelhantes também foram obtidos para a proteína na presença dos nucleotídeos GTP γ S ou GDP (Fig. 21B), isso porque a proteína é purificada sem nucleotídeo (dados estes que serão apresentados no item 4.3.4). No entanto, é possível observar um pequeno aumento da intensidade do pico positivo ~192 nm nos espectros da proteína ligada aos nucleotídeos quando comparado à proteína *apo* e uma mudança sutil na região entre 210-230 nm.

Desta forma, a interação de SEPT9GC com os nucleotídeos GTP γ S e GDP não deve ter alterado significativamente o conteúdo estrutural organizado de SEPT9GC. O que não descarta a ocorrência de sutis rearranjos estruturais em regiões pouco organizadas (tais como *loops*), capazes de afetar as transições na região ~192 nm e 210-230 nm.

A desconvolução dos espectros de CD de SEPT9GC para estimar o conteúdo de estruturas secundárias da proteína, indicou um conteúdo de 32% de hélice- α , 23% de folhas- β e 43% de outras estruturas. Esses dados vão de acordo com aqueles já reportados na literatura, onde as estruturas do tipo α -hélice são predominantes em estruturas secundárias de septinas (GARCIA et al., 2006b; NAKAHIRA et al., 2010; MACEDO et al., 2013).

4.3.4 Análise do teor de nucleotídeo e Atividade GTPásica de SEPT9GC

Para avaliar o teor de nucleotídeo e a atividade GTPásica de SEPT9GC, utilizou-se o protocolo de desnaturação química com ácido hiperclórico, descrito por Seckler e colaboradores no item 3.2.6 na seção de Metodologia.

Inicialmente uma coluna de troca aniônica foi calibrada com os nucleotídeos GDP e GTP e em seguida 20 μ M de SEPT9GC desnaturada foi analisada em HPLC, afim de investigar se a proteína se encontrava complexada a nucleotídeo. No entanto, nenhum pico correspondente aos nucleotídeos é observado no cromatograma correspondente a amostra de SEPT9GC desnaturada (Fig. 22), inferindo-se assim, que SEPT9GC encontra-se na forma apo, assim como visto também para SEPT3 (MACEDO et al., 2013)

Figura 22: Análise do teor de nucleotídeo de SEPT9GC desnaturada. Ambos nucleotídeos estavam a uma concentração de 200 μ M. Todas as amostras passaram por tratamento com ácido hiperclórico e o sobrenadante foi analisado por HPLC em uma coluna de troca aniônica. A cromatografia foi realizada sob um fluxo de 1 mL/min a temperatura ambiente.

Fonte: Elaborada pela autora.

Confirmado que SEPT9GC na forma que ela foi purificada encontra-se na forma apo, passou-se então, a investigar sua capacidade de hidrolisar GTP. Assim, a proteína apo foi incubada com GTP em uma proporção de 3:1 (GTP : proteína), a 20 °C, durante 5 horas.

Inicialmente foram retiradas alíquotas da mistura em intervalos de 5 min durante 1 hora e nas 4 horas seguintes alíquotas foram retiradas em intervalos de 20 minutos. As alíquotas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para parar a possível reação de hidrólise do GTP. Em seguida, as amostras foram desnaturadas com ácido hiperclórico e analisadas em HPLC. Na figura 23A estão apresentados alguns dos cromatogramas sobrepostos, os quais permitem concluir que SEPT9GC foi capaz de hidrolisar GTP em GDP.

Figura 23: Análise da atividade GTPásica da SEPT9GC. SEPT9GC (20 μ M) foi incubada com 60 μ M de GTP durante 5 h a 20 °C. A) Sobreposição de nove cromatogramas referentes a reação de hidrólise de GTP, os demais cromatogramas foram omitidos para uma melhor visualização dos resultados. B) Porcentagem de hidrólise de GTP e subsequente porcentagem de formação de GDP ao longo do tempo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se que a hidrólise de GTP começou a ficar evidente após 15 minutos de reação (Fig. 23A). Observa-se ainda, que uma conversão quase total de GTP em GDP ocorre após 180 min de reação (Fig. 23B). Esses dados revelam que a atividade GTPase de SEPT9GC é similar àquela reportada para SEPT3 em estudos anteriores onde após 1 h de reação, SEPT3 foi capaz de hidrolisar todo GTP, nas mesmas condições experimentais de SEPT9 (MACEDO, *et al* 2013).

Apesar dos dados aqui apresentados não reportarem constantes cinéticas como K_m e k_{cat} , estudos de cinética realizados por Zent et al., 2014 com SEPT2, SEPT6, SEPT7 e SEPT9, relatam que SEPT9 dentre as septinas estudadas é a que apresenta taxa de hidrólise mais elevada

($k_{cat} = 0.064 \text{ min}^{-1}$), característica esta que foi atribuída ao seu estado monomérico (Zent et al., 2014). Como reportado na literatura, em todas as estruturas cristalinas de complexo septina-nucleotídeo, assim como a estrutura de SEPT9-GDP/GTP apresentada nesse trabalho, o nucleotídeo encontra-se totalmente ocluso/escondido no sítio ativo da proteína e a sua liberação poderia ser dependente da estabilidade do dímero e da sua dissociação em monômero. Tal observação foi confirmada ao realizar hidrólise de GTP com mutantes de SEPT2 e SEPT7 que mostraram ser monoméricas em solução assim como SEPT9. Observou-se que em ambos os casos as velocidades de hidrólise foram mais rápidas em comparação as proteínas de tipo selvagem (dímero) (SIRAJUDDIN et al., 2007; ZENT; VETTER; WITTINGHOFER, 2011; ZENT; WITTINGHOFER, 2014).

O estado monomérico e a falta de nucleotídeo ligado, talvez estejam relacionados. No caso de SEPT3 que é purificada como monômero, observou-se uma tendência para formar dímeros na presença de GTP. Acredita-se que o aumento da atividade GTPásica de SEPT9, seja devido ao GDP sair do monômero com mais facilidade.

4.3.5 Avaliação da ligação dos nucleotídeos por Calorimetria de Titulação Isotérmica – ITC

A obtenção da proteína na forma apo permitiu iniciar a caracterização da ligação de nucleotídeo de guanina a SEPT9GC. Tanto a afinidade da proteína SEPT9GC pelos ligantes quanto a influência do cofator (íon Mg^{2+}) na ligação foram avaliadas por calorimetria de titulação isotérmica.

Para os estudos de interação, a concentração de SEPT9GC variou dependendo do nucleotídeo que seria titulado. Ao ser titulado com 0,8 mM de $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (Fig. 24A) a proteína estava a uma concentração de 24 μM e ao ser titulado com 3 mM de GDP (Fig. 24C) SEPT9GC estava a uma concentração de 15 μM . As mesmas concentrações foram utilizadas para os experimentos com tampão sem Mg^{2+} e para garantir a ausência do íon adicionamos ao tampão 1 mM de EDTA. Novamente, ajustes na concentração da proteína foram necessários para obter as curvas de titulação que são características de reações exotérmicas. Assim, a partir destas curvas, parâmetros termodinâmicos como a constante de associação (K_a), constante de dissociação (K_d), entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) puderam ser obtidos utilizando-se o *software* Microcal® ITC Origin TM.

As curvas foram ajustadas ao modelo de ligação de um sítio e a estequiometria da reação (n) foi fixada em 1, uma vez que é sabido que estas proteínas possuem um único sítio de ligação. Este procedimento de fixar o n foi necessário devido à baixa afinidade da proteínas aos ligantes, o que resulta em um valor de c ($K_a[M]_0$) menor que 1. Este valor não se encaixa na faixa desejada de c, entre 1-1000, para a obtenção de boas curvas de titulação. No entanto, a fixação do parâmetro n tem sido uma prática bastante usual para proteínas com $c < 0,1$ e tem-se mostrado que este procedimento não altera as constantes calculadas (TELLINGHUISEN, 2007, 2008).

Nessas condições experimentais, SEPT9GC apresentou uma afinidade por GTP γ S, com K_d de 25.9 μ M (Tabela 8), valor este inferior a aquele apresentada para SEPT3, com K_d de 5.43 μ M (MACEDO et al., 2013). No entanto, este valor não é inesperado, uma vez que são reportados valores de K_d para septinas, todas na faixa de micromolar (μ M). SEPT2 humana, por exemplo, apresentou afinidade por GTP γ S, com K_d de 0,28 μ M na presença de 5 mM de Mg^{2+} (HUANG et al., 2006b). Os complexos de septinas de *S. cerevisiae* Cdc3-Cdc12, Cdc3-Cdc11-Cdc12 e Cdc3-Cdc10-Cdc12, apresentaram valores de K_d 1,6 μ M, 6,2 μ M e 5 μ M, respectivamente (FARKASOVSKY et al., 2005). Apesar desses valores serem comparáveis com algumas GTPases, como Cdc e Rho, eles são bem inferiores às afinidades reportadas para GTPases Ras, que possuem K_d na escala de picomolar (JOHN et al., 1993; ZHANG et al., 2000).

Como apresentado na figura 24B, na ausência de Mg^{2+} a proteína SEP9GC não apresentou interação com o nucleotídeo GTP γ S. Por outro lado apesar da baixa afinidade por GDP, o cofator parece não ter influenciado na ligação de GDP (dados não mostrados), assim como visto para *Sm*SEPT10 (ZERAİK et al., 2014).

SEPT9GC possui uma afinidade por GTP γ S maior que por GDP e dependente do íon Mg^{2+} como esperado, isso permitiu obter a estrutura de SEPT9 complexada com GTP γ S como será mostrado na discussão que segue sobre as estruturas de SEPT9.

Figura 24: Isotermas de titulação de SEPT9GC. (A) SEPT9GC 24 μM , em tampão fosfato na presença de 5 mM de MgCl_2 titulada com 0,8 mM de $\text{GTP}\gamma\text{S}$; (B) SEPT9GC, 24 μM , em tampão fosfato, 1 mM de EDTA na ausência de MgCl_2 titulada com 0,8 mM de $\text{GTP}\gamma\text{S}$ SEPT9 $\alpha 0$, (C) SEPT9GC 15 μM , em tampão fosfato na presença de 5 mM de MgCl_2 titulada com 3 mM de GDP.

Fonte: Elaborada pela autora.

A tabela 8 apresenta os valores obtidos para os parâmetros termodinâmicos da reação de ligação de SEPT9GC aos nucleotídeos de guanina, GTP γ S e GDP.

Tabela 8: Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir das titulações de SEPT9GC com os nucleotídeos de guanina na presença 5 mM de Mg²⁺.

	ΔH (kcal/ mol)	T ΔS (kcal/ mol)	K _d (μ M)
SEPT9GC+ GTP[S]	-5.37 $\pm$ 1.25	-0.17 $\pm$ 0.04	25.9 $\pm$ 2.50
SEPT9GC+ GDP	-3.68 $\pm$ 1.60	-0.44 $\pm$ 0.09	60.9 $\pm$ 3.45

Fonte: Elaborada pela autora.

5.0 ESTRUTURAS DE SEPT9

Durante o doutorado foram realizados ensaios de cristalização do complexo de septinas 2/6/7/9, do heterodímero 7/9 e das construções de SEPT9 α 0 e SEPT9GC. Tínhamos como principal objetivo obter informações estruturais do complexo, porém ainda não obtivemos cristais dos mesmos. No entanto, obtivemos sucesso na cristalização de SEPT9GC, que permitiu estudar a interface NC que é fisiológica.

Obtivemos três estruturas cristalográficas de SEPT9GC. Dois conjuntos de dados de SEPT9GC complexado a GDP e um conjunto de dados de SEPT9GC complexado a GTP γ S. Interessantemente, essa última estrutura de SEPT9 complexada ao nucleotídeo GTP γ S foi obtido através do método de *soaking*, sendo o uso desse método reportado pela primeira vez para septinas. A partir das estruturas cristalográficas de SEPT9 foi possível analisar questões bastante interessantes como verificar o fenômeno de promiscuidade nas interações entre septinas, fenômeno este que já foi visto para SEPT3 que é do mesmo grupo, sendo na época o único exemplo do Grupo I de septinas.

Uma outra questão importante está relacionada com a interface NC de SEPT9GC. No filamento de septinas humanas, SEPT9 ocupa a posição terminal do complexo octamérico junto com SEPT2, SEPT6 e SEPT7 formando a seguinte sequência: SEPT9-SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9 (NAKAHIRA et al., 2010; KIM et al., 2011; SANDROCK et al., 2011; SELLIN et al., 2011). Na Figura 25, está apresentado um modelo de como as septinas se dispõem no heterofilamento formando um octâmero. Ressaltando, que este é um modelo bem estabelecido embora não tenha nenhuma estrutura cristalográfica.

Figura 25: Representação esquemática das interações septina-septina esperadas dentro do heterofilamento, baseadas em dados de ensaios de duplo híbrido em levedura. Nesta figura está ilustrado a possível disposição da SEPT9 dentro do complexo SEPT2 -SEPT6-SEPT7, assim como a sua interface G e NC.

Fonte: Adaptada de (NAKAHIRA; MACEDO *et al.*, 2010).

A interface G entre duas cópias de SEPT9 encontradas nas estruturas cristalográficas descritas a seguir, é descrita como promiscua, uma vez que ela não deva existir no octâmero onde a SEPT9 forma uma interface G com SEPT7 (Fig. 25). Porém, a interface NC é fisiológica e uma das mais importantes interfaces a ser caracterizada, pois esta é a interface responsável pela polimerização dos protofilamentos (SIRAJUDDIN *et al.*, 2007). Na estrutura de SEPT9 a alta resolução foi possível obter informações a respeito de ambas interfaces.

5.1 Ensaios de cristalização de SEPT9GC-GDP

Ensaios de cristalização utilizando a construção SEPT9GC α 0 não resultou em cristais desta proteína. Assim, optamos pela construção SEPT9GC contendo o domínio GTPase e o C-terminal da proteína, pois tal construção apresentou maior estabilidade possibilitando assim, a obtenção de informações estruturais da mesma.

Para os primeiros testes de cristalização, a proteína SEPT9GC purificada na forma apo (livre de nucleotídeo) a uma concentração de 2,0 mg/mL foi incubada com 1 mM de GDP. Os cristais foram obtidos através do método de difusão de vapor. Inicialmente, na etapa automática utilizando o robô de cristalização *Honeybee* (Genominc Solutions Inc), obtivemos aglomerados de cristais muito pequenos através do método de *sitting drop*, fazendo-se assim, necessário um refinamento da condição inicial de cristalização. Nesta etapa, os ensaios de cristalização foram realizados manualmente utilizando o método de *hanging drop*. Os testes foram feitos variando a concentração da proteína, temperatura de cristalização e também a utilização da técnica de *seeding*. No entanto, os melhores cristais foram obtidos com a proteína a uma concentração de

4,2 mg/mL e 1,5 mM de GDP, crescidos a temperatura de 18 °C e sem o uso do método de *seeding*. Para os ensaios realizados sem adição de nucleotídeo não obtivemos sucesso, uma vez que a amostra precipitava na gota. A construção de SEPT9GC resultou nos cristais observados na Figura 26.

Figura 26: Cristais de SEPT9GC. Cristais obtidos na co-cristalização de SEPT9GC a 4,2 mg/mL e 1,5 mM de GDP, condição de cristalização: PEG 1500 24% e Glicerol 20%.

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir dos cristais obtidos na co-cristalização de SEPT9GC ligado ao nucleotídeo GDP foi possível obter dois conjuntos de dados de difração. O primeiro conjunto de dados foi obtido no Laboratório de Biologia Estrutural IFSC-USP a 2.8 Å, em colaboração com o Dr. Humberto D’Muniz Pereira e o segundo foi obtido no *SOLEIL Synchrotron* (Saint Aubin – França) a 2.1 Å em colaboração com o Prof. Dr. Eduardo Horjales Reboredo.

Visando também obter cristais de SEPT9GC complexado com um análogo não hidrolisável de GTP, foram realizados vários testes de co-cristalização de SEPT9GC com os nucleotídeos GTP γ S ou GppNHP. No entanto, não obtivemos cristais a partir da co-cristalização com esses nucleotídeos. Porém, os resultados obtidos de SEPT9GC por Calorimetria de Titulação Isotérmica – ITC, revelaram que SEPT9GC possuiu uma afinidade por GTP γ S maior que por GDP (Tabela 8). Assim, a partir dos melhores cristais obtidos de SEPT9GC-GDP, ensaios de *soaking* foram realizados com GTP γ S. Através desse método foi possível obter um conjunto de dados no *SOLEIL Synchrotron* (Saint Aubin – França) a 2.8 Å, também em colaboração com o Prof. Dr. Eduardo Horjales Reboredo.

Os resultados relativos a coleta de dados e os parâmetros do processamento encontram-se na Tabela 9. As estruturas foram depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) sob os códigos

5CYO e 4YQF para a forma ligada a GDP a alta e baixa resolução, respectivamente, e 5CYP para a forma ligada a GTP γ S.

Tabela 9: Coleta de dados e parâmetros do refinamento.

Coleta de Dados	SEPT9 (GTP γ S)	SEPT9GC (GDP) Alta resolução	SEPT9GC (GDP) Baixa resolução
Grupo Espacial	$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$
Parâmetros da Cella Unitária	74.59, 79.16, 108.22	57.50, 78.05, 77.44	57.04, 77.52, 77.90
a, b, c (Å)			
Ângulos (°)	90.0, 100.4, 90.0	90.0, 105.92, 90.0	90.0, 105.81, 90.0
Detector			
Fonte de Raio X	PROXIMA 1	PROXIMA 1	Raxis - IV
Comprimento de onda (Å)	0.9801	0.9801	1.5418
Faixa de resolução(Å)	50.00 - 2.89 (3.07-2.89)	55.29 - 2.035 (2.16-2.035)	20.00 - 2.75 (2.9-2.73)
Multiplicidade	3.2 (3.1)	3.2 (3.1)	3.5 (3.33)
R_{meas} (%)	14.5 (78.9)	9.1 (87.5)	14.3 (80.7)
CC (1/2)	99.5 (81.4)	99.8 (69.4)	99.3 (74.9)
Completeza (%)	97.6 (95.2)	99.0 (97.4)	98.4 (93.5)
Reflexões total	85974 (13284)	131992 (20750)	61083 (8683)
Reflexões únicas	27279 (4266)	41929 (6631)	17271 (2606)
$I / \sigma(I)$	8.57 (1.90)	11.20 (1.99)	10.57 (1.92)
Parâmetros de Refinamento			
Reflexões usada para refinamento	27181	41903	17265
R (%)**	25.22	18.33	20.76
R_{Free} (%)**	29.74	22.75	24.93
n° de átomos de proteína	7117	4183	4007
n° de moléculas de água	0	233	81
B (Å ²)			
Proteína	61.23	42.99	44.70
Ligante	41.24	28.48	24.96
Água	0.00	44.17	35.80
Estimativa de erro			
Erro de coordenadas (Å)	0.40	0.25	0.39
Erro de fase (°)	37.14	24.40	26.08
Ramachandran Plot			
Favored (%)	95.92	97.68	96.15
Allowed (%)	4.08	2.32	3.85
Outliers (%)	0.00	0.00	0.00
All-atom clashcore	5.14	3.23	4.50
RMSD from ideal geometry			
r.m.s. bond lengths (Å)	0.002	0.004	0.003
r.m.s. bond angles (°)	0.594	0.735	0.827
Código PDB	5CYP	5CYO	4YQF

Fonte: Elaborada pela autora.

Como pode ser visto na tabela 9, o *soaking* com GTP γ S resultou em uma mudança na cela unitária, que aumentou em volume de $3.34 \times 10^5 \text{ \AA}^3$ para $6.28 \times 10^5 \text{ \AA}^3$. Isto corresponde a um aumento de 1.9 vezes em volume que é compatível com a presença de apenas um dímero na unidade assimétrica no caso do complexo com GDP e dois dímeros no caso do complexo com GTP γ S.

As análises mostraram que na forma cristalina que corresponde ao complexo com GDP, os filamentos se formam no plano *ac* ao longo da diagonal da cela unitária (mostrado em azul na fig. 27). Por outro lado, no complexo com GTP os filamentos estão alinhados na direção *a*, indicando uma nova cela unitária que tem o dobro do tamanho (mostrado em vermelha na fig. 27). A partir da cela azul ($a = 57,5$; $c = 108,3$; $\beta = 100,4^\circ$) é possível calcular os parâmetros esperados para a cela vermelha, supondo que não haja nenhuma distorção da rede. Os valores preditos são $c = 108,4 \text{ \AA}$, que corresponde ao valor determinado experimentalmente para a forma cristalina com GTP ($108,2 \text{ \AA}$) e $a = 82,0 \text{ \AA}$, que é significativamente maior que o valor de $74,2 \text{ \AA}$, observado experimentalmente. Esta diferença pode ser explicada pelo encurtamento do filamento quando complexado a GTP, que é da ordem de $8 \text{ \AA}$ (tomando o resíduo central H134 como referência). A consequência é que o ângulo β observado também é menor ($100,4^\circ$) que o predito na base da cela unitária azul ($108,8^\circ$). Uma análise da transformação de uma forma para outra só precisa levar em conta as mudanças no plano *ac*, uma vez que o eixo *b* apenas muda de sentido mas mantém o seu tamanho ($b = 78,05$ com GDP e $b = 79,16$ com GTP).

Figura 27: Transformação da cela unitária de SEPT9GC influenciada pela troca do nucleotídeo. Em azul esta destacada a cela unitária de SEPT9GC-GDP e em vermelho a cela unitária de SEPT9GC-GTP γ S. O homofilamento gerado por SEPT9GC estar representado na cor salmão.

5.2 Análise da estrutura de SEPT9GC-GDP

A estrutura de SEPT9GC-GDP resolvida a 2.7 Å de resolução foi preliminar e toda a discussão nesse trabalho com SEPT9 complexada a GDP será feita com a estrutura obtida a 2.1 Å, por ser de mais alta resolução.

A Figura 28 mostra um alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos correspondentes ao domínio GTPase de septinas humanas (SEPT1-SEPT12 e SEPT14) e *SmSET10 de Schistosoma mansoni* (*SmSEPT10*). Este alinhamento foi obtido fazendo uso do programa Jalview 2.8.2 (WATERHOUSE et al., 2009) em colaboração com o mestrando Diego Leonardo para estudos de modelagem molecular realizados em paralelo a este trabalho. O alinhamento destaca todos os aminoácidos conservados em septinas, assim como os que são restritos à apenas um grupo. Toda a discussão da estrutura, assim como a numeração dos

resíduos e localização dos componentes de estrutura secundárias será baseada no alinhamento da Figura 28.

No entanto, vale ressaltar algumas informações importantes referentes ao domínio usado para realizar o alinhamento. Apesar desse domínio GTPase ser o mais conservado em septinas, até hoje pouco se conhecesse sobre a atividade GTPase dessas proteínas e como esse mecanismo influencia nas funções exercidas pelas septinas.

Como se pode observar no alinhamento, dentre todas as regiões que compõem o domínio GTPase, o motivo G1 (*P-loop*), é o mais conservado. Ele é caracterizado pelo consenso GxxGxGKST (BOURNE; SANDERS; MCCORMICK, 1991), levando a classificação das septinas para a superclasse das *P-loop* GTPases (SARASTE; SIBBALD; WITTINGHOFER, 1990; FIELD; KELLOGG, 1999b; LEIPE et al., 2002). Neste motivo, destacam-se resíduos conservados em septinas: Lys36, Ser37 e Thr38. Como já observado nas estruturas de septinas disponíveis, a Lys36 interage com os fosfatos β e γ do nucleotídeo, a Ser37 interage com o Mg^{2+} e a Thr38 forma ligação de hidrogênio com o fosfato α (SIRAJUDDIN et al., 2009).

Figura 28: Alinhamento do domínio GTPase das septinas humanas e *SmSEPT10*. Os aminoácidos conservados para cada sub-grupo de septinas são mostrados em cores: verde, azul, vermelho e amarelo para os sub-grupos correspondentes a SEPT3, SEPT6, SEPT2 e SEPT7, respectivamente. Os elementos de estrutura secundária são mostrados na sequência de *SmSEPT10* em laranja para as β -fitas e violeta para α -hélices. As regiões estruturais que são importantes e comuns a pequenas GTPases são mostradas em caixas transparentes e os motivos específicos de septinas são mostrados em caixas sombreadas.

Outro motivo importante em septinas é o *switch* I, onde a Thr64 além de coordenar o íon magnésio é o aminoácido determinante para a hidrólise de GTP (SIRAJUDDIN et al., 2009; ZERAIK et al., 2014). O motivo G3 que faz parte do *switch* II é caracterizado pelo consenso DxxG, e apresenta a glicina conservada (Gly90) que interage com o γ fosfato do GTP no complexo com GTP e geralmente está desordenado em complexos com GDP. A Thr64 juntamente com a Gly90, mediam o mecanismo de *switch* universal, de modo que a cadeia principal da amida de cada um desses aminoácidos formem ligação de hidrogênio com o fosfato γ , o qual é liberado após a hidrólise do GTP (SIRAJUDDIN et al., 2009).

O motivo G4, caracterizado pelo consenso xKxD conservado em septinas, correspondente à sequência AKAD (resíduos 169-172)(Fig. 28), o qual determina a especificidade à ligação do GTP por meio da formação de ligações do tipo ponte de hidrogênio entre o resíduo Asp172 com a base guanina (SARASTE; SIBBALD; WITTINGHOFER, 1990; LEIPE et al., 2002; HALL; RUSSELL; PRINGLE, 2008).

Como apresentado no alinhamento, SEPT9 faz parte do grupo da SEPT3 junto com SEPT12 e os resíduos característicos deste grupo estão indicados em verde. Estes resíduos por definição estão presentes em todas as sequências do grupo e nunca pertencentes nos demais grupos.

Como se pode observar na Figura 29, SEPT9GC-GDP apresentou como esperado, um enovelamento característico de septinas constituído de: 6 fitas- β centrais, onde observa-se que a β 2 é a única fita que se encontra antiparalela em relação as demais fitas; uma extensão característica dessa classe de proteína conhecido como elemento único de septinas (SUE) que compreende as fitas- β 9,10,7,8 (nesta ordem) e as α -hélices 1-5, 5'e 6.

Figura 29: Estrutura de SEPT9GC-GDP a 2.1 Å. Obteve-se um dímero na unidade assimétrica do cristal. A ordem das β -fitas e as α -hélices encontram-se enumeradas no monômero da direita; as β -fitas estão representadas em azul e as α -hélices em vermelho.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como já descrito anteriormente, SEPT9GC é purificada como um monômero livre de nucleotídeo, o que permitiu sua caracterização em termos de ligação ao GTP, assim como sua hidrólise. No entanto, observa-se que na unidade assimétrica da estrutura SEPT9GC-GDP é composta por duas cadeias polipeptídicas (A e B), formando um dímero (Fig. 29). As subunidades estão relacionadas por um eixo de ordem 2 não cristalográfico e interagem por meio de uma interface G. Vale ressaltar ainda, que apesar da construção SEPT9GC incluir a região GTPase (G) e o C-terminal, na estrutura cristalográfica não aparece o C-terminal completo, tanto na estrutura a baixa quanto na de alta resolução, o que pode ser devido a sua flexibilidade, como observado também no complexo 2-6-7 humano.

Assim como todas as estruturas de septinas complexada a GDP publicadas até o momento, SEPT9GC-GDP também forma filamento dentro do cristal que pode ser facilmente

observado com a expansão da rede cristalina (Fig. 30). O filamento apresenta eixos de ordem 2 não-cristalográficos perpendiculares ao eixo principal do filamento.

Figura 30: Homofilamento presente no cristal de SEPT9GC a 2.1 Å de resolução. A cadeia ‘A’ está representada na cor verde e a cadeia ‘B’ na cor ciano. As interfaces G e NC encontram-se destacadas na figura.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na figura 31 está apresentado o homofilamento de SEPT9 destacando a região SUE (Elemento Único de Septina). Essa região do SUE compõe elementos importantes para formar as interfaces G e principalmente a interface NC, fazendo com que septinas formem filamentos, enquanto outras pequenas GTPases não formam.

Figura 31: Homofilamento presente no cristal de SEPT9GC a 2.1 Å de resolução. A cadeia ‘A e B’ estão representadas na cor ciano e a região do SUE encontra-se colorida em azul.

Fonte: Elaborada pela autora.

A polimerização do filamento de SEPT9GC emprega as mesmas interfaces observadas no complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7 (SIRAJUDDIN et al., 2007) e nas estruturas de domínio GTPase de septinas individuais disponíveis, a interface G e interface NC. A interface G utiliza a região do sítio de ligação do nucleotídeo e a interface NC as regiões N- e C- terminal dos domínios GTPases (Fig. 32). Na figura 32 destaca-se a presença do nucleotídeo GDP e as interfaces G e NC da estrutura SEPT9GC-GDP.

Figura 32: Interfaces da estrutura SEPT9GC-GDP a 2.1 Å. A cadeia ‘A’ está representada na cor verde e a cadeia ‘B’ na cor ciano. Os nucleotídeos associados a cada molécula também estão representados marcados com as setas.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.1 Interface G de SEPT9GC-GDP

Na estrutura de SEPT9GC-GDP, observa-se que a estabilização da interface G ocorre através das mesmas contribuições de estruturas secundárias já descrita para outras septinas (SEPT3, SEPT7 e SEPT2), com poucas modificações. Os resíduos envolvidos no sítio de ligação do nucleotídeo pertencem principalmente às regiões do P-loop (G1), *Switch I*, *Switch II* (G3) e G4, assim como já demonstrado para uma interface G canônica.

A figura 33, mostra as principais interações específicas feitas na interface G por um dos monômeros de SEPT9GC complexado a GDP. Os resíduos 33-37 do *P-loop*, correspondentes ao G1, são responsáveis pelas interações mais importantes envolvidas na estabilização do grupo fosfato do nucleotídeo. Nessa região é possível observar que: os grupos amino da cadeia principal dos resíduos Gly33, Leu32, Gly35 e Lys36 formam ligações de hidrogênio com o fosfato-β e que as cadeias principais da Ser37 e Thr38 estão apropriadamente orientadas de modo a interagir com o fosfato-β e α respectivamente.

No motivo G4 tem-se a Asp172 do motivo específico de septina AKAD já descrito anteriormente, que juntamente com a Thr173 (B) e Gly 226 interagem com a base guanina

coordenando-a. A cadeia lateral da Asp172 forma duas ligações de hidrogênio com N1 e o grupo NH₂ exocíclico na posição 2 da base guanina.

Os *switchs* I e II encontram-se estruturalmente ordenados na estrutura de SEPT9-GDP. Em muitas pequenas GTPases os *switchs* se encontram desordenados na forma complexada com GDP, tornando-se ordenados apenas quando na presença de GTP. Esta diferença provavelmente se deve a presença do íon Mg²⁺. É possível observar na região do *Switch* I, que a cadeia lateral da Thr64 é um dos seis ligantes que coordena diretamente o íon Mg²⁺, assim como visto para SEPT3 complexada a GDP na presença do íon. Por outro lado, a estrutura da SEPT2 apresenta os *switchs* ordenados apenas na presença de um análogo de GTP (GppNHP) e Mg²⁺. Esses dados sugerem que o comportamento “anômalo” da SEPT9 em apresentar os *switchs* ordenados no complexo com GDP é devido a presença do íon Mg²⁺. Tentativas de cristalizar SEPT9 com GDP e na ausência de Mg²⁺ foram realizadas, porém não obtivemos cristais da proteína.

Vale ressaltar ainda, que na estrutura de *Sm*SEPT10 que pertence ao Grupo II das septinas composto por SEPT6, SEPT8, SEPT10, SEPT11 e SEPT14 o *Switch* I não participa da interação com o magnésio. Esse subgrupo é o único que não possui a Thr conservada no *Switch* I e apresenta uma deleção de cinco resíduos anteriores a Thr conservada nas demais septinas. Nesse subgrupo a Thr conservada é substituída pelo resíduo Glu (Fig. 28).

Na estrutura de SEPT9GC-GDP, o íon magnésio é coordenado pelo fosfato-β, Thr51, Ser19 e três moléculas de água. Na figura 34 está apresentada a densidade eletrônica da região do sítio de ligação do nucleotídeo onde se encontra o magnésio.

Figura 34: Resíduos de aminoácidos envolvidos na coordenação do íon Mg^{2+} por SEPT9GC. O íon Mg^{+2} está representado em verde e as moléculas de água em vermelho. Densidade $2F_{obs}-F_{calc}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se na figura 34 que Asp87 (*Switch II*) assegura uma molécula de água (w249) que por sua vez coordena o íon Mg^{2+} . O fosfato- β , as cadeias laterais da Thr64 (*switch I*) e Ser37 (P-loop) juntamente com duas moléculas de água (w1 e w2) completam a coordenação do magnésio (hexa ordenado). O envolvimento da Thr64 e Asp87 garantem que os dois *switches* fiquem fechados em cima do nucleotídeo.

Observou-se pela primeira vez em septinas na estrutura de SEPT9GC-GDP, que o loop correspondente aos resíduos 47-68, o qual inclui o *switch I*, apresentou densidade eletrônica contínua nessa região (Fig. 35). É possível observar resíduos do *loop* fazendo três ligações de hidrogênio com a fita- $\beta 9$ que se encontra antiparalelo ao mesmo. A primeira ligação de hidrogênio é feita pela cadeia principal da Glu58 com Asp228 que é um aminoácido pertencente apenas ao grupo de SEPT9 (Grupo I). As outras duas ligações de hidrogênio são feitas pela Thr56 com a Glu230. Além dessas interações, resíduos desse loop fazem um contato importante entre os filamentos gerados pela estrutura de SEPT9GC-GDP que serão explicados com mais detalhes no tópico que descreve a interface NC.

Figura 35: Estruturas de SEPT9GC-GDP a 2.1 Å destacando o loop que corresponde aos resíduos 36-54. A) Estrutura de SEPT9GC-GDP evidenciando as regiões com maiores valores de B_{factor} (regiões coloridas em vermelho, amarelo e alaranjado). B) Ligações de hidrogênio feita pelos resíduos Glu45 e Thr43 (correspondente ao loop que conecta hélice $\alpha 1$ e fita $\beta 2$) com a fita $\beta 9$.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.2 Interface NC de SEPT9GC-GDP

As regras de Kinoshita propõem que as septinas tendem a interagir com septinas de grupos diferentes e que as septinas do mesmo grupo, poderiam substituir suas parceiras de grupo dentro do complexo formado por SEPT2, SEPT6 e SEPT7. Isso leva a crer que devam existir características estruturais conservadas entre membros do mesmo grupo que permitam a sua troca no contexto de um filamento fisiológico. Além disto, espera-se que a regra também seja válida para o quarto grupo de septinas (grupo I, a qual pertence a SEPT9) que foi identificado na extremidade de complexos octaméricos com o seguinte arranjo genérico I-IV-II-III-III-II-IV-I. A regra de substituição dentro do grupo gera 60 combinações teoricamente possíveis ($3 \times 1 \times 5 \times 4$) e leva a crer que deva existir características estruturais conservadas entre membros do mesmo grupo que permitam a sua troca no contexto de um filamento fisiológico.

Assim, a determinação da estrutura da SEPT9GC relatada nesta tese, permite pela primeira vez, comparar diferentes membros de um mesmo grupo, como por exemplo SEPT9 e SEPT3.

Nesse sentido, foram realizadas várias comparações da estrutura de SEPT9 com a estrutura de SEPT3, afim de obter informações estruturais importantes na montagem do filamento e comuns a SEPT3 e SEPT9. Ressaltando ainda, que tais proteínas pertencem ao mesmo grupo de septinas e compartilham em sua estrutura primária de aminoácidos comuns ao grupo que pertencem (Grupo I).

Analisando a estrutura de SEPT9GC-GDP, foi possível observar algumas semelhanças com a estrutura de SEPT3GC-GDP, assim como diferenças importantes na interface NC responsável pela formação dos filamentos a partir de complexos octaméricos. Ressaltando, que as estruturas de SEPT3 complexadas a GTP (código 4Z51) e GDP (código 4Z54) a 1.91 Å e 1.88 Å respectivamente, foram obtidas pela Dr. Joci Neuby Macedo e gentilmente cedidas para uma comparação estrutural com SEPT9 apresentada nesta tese.

Na estrutura mais antiga de SEPT3-GDP a 2.9 Å (código 3SOP), a orientação da hélice $\alpha 5'$ foi descrita como sendo significativamente diferente das demais septinas e um dos fatores importantes para mediar interações na interface NC (MACEDO et al., 2013). Esta observação continua válida após a determinação da estrutura a mais alta resolução (4Z54). Nesse contexto, sobrepomos as estruturas de SEPT9-GDP, SEPT3-GDP e SEPT2-GDP, afim de verificar se a orientação da hélice $\alpha 5'$ na estrutura de SEPT9GC-GDP se comportava como na estrutura de SEPT3-GDP (Fig. 36). Ressaltando, que a ênfase do estudo foi colocada na interface NC por ser uma interface fisiológica e não promíscua.

Figura 36: Comparação da orientação da hélice $\alpha 5'$ de SEPT3, SEPT9 e SEPT2. A) Sobreposição das estruturas de SEPT3 (código 3SOP), SEPT9 (código 5CYO) e SEPT2 (código 2QNR), coloridas em verde, ciano e vermelho respectivamente. B) Sobreposição das estruturas de SEPT3 (verde) e SEPT9 (ciano) mostrando a interação hidrofóbica da Phe203 com Val276 e Ile280 na estrutura de SEPT3 e com Ile276 e Ile280 na estrutura de SEPT9.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como se pode observar na figura 36, a hélice $\alpha 5'$ (resíduos 207-219) na estrutura de SEPT9GC-GDP apresentou a mesma orientação da hélice $\alpha 5'$ de SEPT3GC-GDP e ambas estruturas diferiram da $\alpha 5'$ da estrutura de SEPT2-GDP (Fig. 36 A). A figura também mostra que a re-orientação da $\alpha 5'$ parece estar relacionada com um ajuste simultâneo da hélice $\alpha 4$ também.

Tais mudanças nas estruturas estão relacionadas a resíduos conservados apenas nos membros do subgrupo da SEPT9, a Pro199, Gln200 e Phe203, todos localizados no loop entre as hélices $\alpha 4$ a $\alpha 5'$. Na estrutura de SEPT9GC-GDP, o aminoácido Phe203 faz interações hidrofóbicas com a Ile276 e Ile280 da hélice $\alpha 6$. Interações equivalentes são encontradas na estrutura de SEPT3GC-GDP onde a fenilalanina homóloga faz contato hidrofóbico com Val276 e Ile280 (Fig. 36B). Esse mesmo conjunto de resíduos nas estruturas de SEPT3GC-GDP e SEPT9GC-GDP interagem de forma a aproximar as hélices $\alpha 5'$ da $\alpha 6$. Essa aproximação faz com que a hélice $\alpha 5'$ em ambas estruturas apareça com uma inclinação de aproximadamente 40° quando comparada com a hélice $\alpha 5'$ de SEPT2 (e septinas dos demais grupos). Tanto em

SEPT9 quanto em SEPT3 a interação feita pelo Phe203 é facilitada pela presença da Pro199 que altera o percurso do loop entre $\alpha 4$ e $\alpha 5'$ permitindo a Phe203 alcançar os resíduos hidrofóbicos da hélice $\alpha 6$. A orientação distinta da hélice $\alpha 5'$ portanto parece ser uma característica das septinas do grupo I e está intimamente relacionada com a presença dos resíduos Pro199, Phe203 e Ile280 conservados somente neste grupo.

No caso da estrutura de SEPT3-GDP essa re-orientação da hélice $\alpha 5'$ leva a uma aproximação em direção a interface NC, que resultou em uma ponte salina feita por Arg124 com Glu202. Essa interação ocorre em duas regiões altamente carregadas: 1) região básica que corresponde ao loop que liga a hélices $\alpha 2$ a fita $\beta 4$ composta pelos resíduos Arg124, Lys125, Lys126 e Arg127; e 2) região ácida que corresponde ao loop que conecta as hélices $\alpha 4$ a $\alpha 5'$, composta por Glu202, Asp204, Glu205 e Asp206, ambas regiões provenientes de diferentes protômeros. A figura 37 mostra a região com esses resíduos carregados onde ocorre uma das interações mais importantes na interface NC de SEPT3GC-GDP. Ressaltando ainda, que o mesmo comportamento foi visto para a estrutura de SEPT3 complexado a GppNHP (código 4Z51).

Figura 37: Interface NC de SEPT3GC-GDP, apresentando em superfície as regiões carregadas correspondentes a contatos importantes para formação da interface NC. Em azul estar apresentados os resíduos carregados positivamente (provinientes da subunidade da esquerda) em vermelho os resíduos carregados negativamente (provinientes da subunidade da direita). As interações estão mostradas em um lado da interface.

Fonte: Adaptada pela autora.

Os resíduos correspondentes às regiões carregadas na estrutura de SEPT3 são conservados em SEPT9 e SEPT12, todos membros do Grupo I. No entanto, a partir das novas

estruturas de SEPT9GC-GDP, observou-se que apesar da $\alpha 5'$ apresentar a mesma orientação que a $\alpha 5'$ na estrutura de SEPT3-GDP, as interações na interface NC que gera o homofilamento são diferentes.

Na figura 38 são apresentadas todas as interfaces NC das estruturas de septinas disponíveis até o momento, ressaltando que tais interfaces foram geradas a partir de homofilamentos. Os grupos estão definidos nas cores verde, azul, vermelho e amarelo que correspondem aos grupos I, II, III e IV respectivamente. A interface está representada de forma simplificada, mostrando principalmente as hélices $\alpha 2$ (horizontal) e $\alpha 6$ (saindo da página) das duas subunidades, uma do lado esquerdo da figura e a outra do lado direito.

Figura 38: Interface NC das septinas 3, 9, 6, 2 e 7. Do lado direito está apresentado as interfaces NC das septinas complexadas a GTP e do lado esquerdo as interfaces NC das septinas complexadas a GDP. O Grupo I é o único que apresenta dois representantes (SEPT3 e SEPT9). As interfaces estão coloridas nas cores correspondentes ao grupo que pertencem.

	GDP	GTP
Grupo I	<div>SEPT3</div>	<div>SEPT3</div>
	<div>SEPT9</div>	<div>SEPT9</div>
Grupo II	<div>SmSEPT10</div>	<div>SmSEPT10</div>
	<div>SEPT2</div>	<div></div>
Grupo IV	<div>SEPT7</div>	<div></div>

Fonte: Elaborada pela autora.

Como se pode observar na figura 38, a interface NC de SEPT3 complexada a GDP e GTP, encontra-se mais fechada quando comparada com as outras estruturas de septinas (SEPT9GC-GDP, SEPT7-GDP, SEPT6-GDP, SEPT6-GTP e SEPT2-GDP), que apresentam uma interface NC aberta. Isto pode ser mais facilmente visualizado verificando a separação entre as hélices $\alpha 6$ das duas subunidades (saindo da página na Fig. 38). No caso da interface aberta, a hélice $\alpha 2$ aponta diretamente para o lateral da $\alpha 6$, que não é o caso para a interface fechada, onde a separação entre as duas hélices $\alpha 2$ é maior. Dentre as interfaces NC apresentadas SEPT9, SEPT3, e SEPT2 são fisiológicas. No caso das septinas do subgrupo de SEPT6 (grupo II) e SEPT7 (grupo IV), as interfaces NC geradas nas estruturas apresentadas são interfaces promíscuas, uma vez que não são preditas para existir fisiologicamente.

Ao compararmos o filamento de SEPT9GC-GDP com SEPT3GC-GDP, que é do mesmo grupo, observou-se que as diferenças vistas na interface NC são reflexos de alterações nas interações feitas por um conjunto de resíduos que são responsáveis pela estabilização da interface. Os principais entre estes resíduos são Glu119 e Arg124 (da região no final da hélice $\alpha 2$) e Glu283 e Arg286 (da hélice $\alpha 6$). Estes quatro resíduos são conservados em todas as septinas humanas mas mesmo assim são capazes de interagir de maneiras totalmente diferentes para gerar as interfaces aberta e fechada. Isto sugere um grau de plasticidade conformacional nessa interface que pode ser visto na Fig. 39.

Figura 39: Interface NC de SEPT9 e SEPT3 com GDP. A) Interface de interação NC de SEPT9GC-GDP. B) Interface de interação NC de SEPT3GC-GDP. Para ambas estruturas a cadeia A está representada na cor ciano e a cadeia B na cor verde.

Fonte : Elaborada pela autora.

A rede de interações feitas na interface da SEPT9GC-GDP é muito parecido com o que foi visto nas estruturas de SEPT2, SEPT7 e SmSEPT10, que é compatível com a sua estrutura aberta. Por outro lado, na forma fechada (apresentada pela SEPT3GC-GDP) o loop entre hélice $\alpha 2$ e fita $\beta 4$ "abraça" a hélice $\alpha 6$ de forma não vista nas estruturas abertas. Somente septinas do grupo I (incluindo SEPT3 e SEPT9) compartilham neste loop de um conjunto de resíduos carregados positivamente (Arg124, Lys125, Lys126, Arg127). Em consequência disto a interface NC de SEPT3GC-GDP apresenta pontes salinas feita pela Arg124(A) e Glu202(B) e pela Lys126(A) e Asp209(B). Glu202 e Asp209 vem da região do loop que antecede a hélice $\alpha 5'$, sendo o último aminoácido conservado apenas em septinas do grupo I, (Fig 37). Estas interações específicas para a forma fechada são possíveis apenas por causa da reorientação da hélice $\alpha 5'$ como mencionado acima. Por envolver vários resíduos conservados apenas em septinas do grupo I as pontes salinas descritas na estrutura de SEPT3GC-GDP só poderiam ser feitas por um outro membro do mesmo grupo. Assim, seria plausível especular que esses resíduos estariam relacionados com a seletividade da interface NC entre membros do Grupo I que formaria a polimerização dos octâmeros. É sabido que esta interface se desfaz em altas concentrações de sal, levando a despolimerização e a produção de octâmeros isolados. Esta observação poderia estar relacionada ao arranjo de pontes salinas descrito acima.

Assim, se a interface fechada, com a formação das pontes salinas descritas acima, fosse uma característica intrínseca das septinas do grupo I, esperaria-se encontrar também na estrutura da SEPT9GC-GDP. Porém, isto não acontece, observando que o loop entre $\alpha 2$ e $\beta 4$ ocupa a mesma posição encontrada em outras estruturas abertas e as pontes salinas feitas na estrutura de SEPT3GC-GDP, não ocorrem mais. Há, portanto, pelo menos duas maneiras de formar uma interface NC.

Como se pode observar na figura 40, a única região em que não há boa sobreposição das estruturas de SEPT3GC-GDP e SEPT9GC-GDP, está no loop entre hélice $\alpha 2$ e fita $\beta 4$. Nessa região do loop, algumas cadeias laterais dos resíduos comuns as duas proteínas apresentam conformações diferentes. No entanto, essa mudança da orientação do loop na estrutura de SEPT9GC-GDP, pode estar relacionada ao empacotamento dos filamentos.

Figura 40: Sobreposição dos monômeros de SEP3GC-GDP e SEPT9GC-GDP. A) Sobreposição dos monômeros inteiros das estruturas de SEPT9 e SEPT3. B) Destaque dos loops que conectam a $\alpha 2$ com a $\beta 4$. SEPT3GC-GDP está representada na cor verde e SEPT9GC-GDP está representada na cor azul.

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se que os filamentos gerados na estrutura de SEPT9GC-GDP interagem entre si através de ligações de hidrogênio que, em princípio poderiam ser responsáveis pela mudança na conformação do loop (Fig. 40A). Porém é difícil afirmar se é a diferença no loop que gera uma interface diferente ou vice versa.

Para avaliar o possível efeito das forças de empacotamento, examinamos a rede de moléculas na forma cristalina da SEPT9-GDP. Como mostra a figura 41B, curiosamente uma das interações realizadas pelos dois filamentos de SEPT9GC-GDP, ocorre entre uma Gln117 da hélice $\alpha 2$ com a Ser52 do outro protômero correspondente a região do loop que conecta a hélice $\alpha 1$ com a fita $\beta 2$. Ambos os resíduos são característicos apenas da SEPT9GC, sendo substituído em SEPT3 por Ala52 e Lys117 (Fig. 28). Esta mesma interação portanto, não é vista nas estruturas da SEPT3 levando a contatos cristalinos diferentes.

Figura 41: Características estruturais de SEPT9GC-GDP a 2.1 Å. A) Filamentos gerados pela estrutura de SEPT9GC-GDP. B) Resíduos responsáveis pelos contatos dos filamentos.

A)

Fonte: Elaborada pela autora.

Ao comparar a interface NC de SEPT9GC-GDP com a interface NC da estrutura de SEPT2-GDP que pertence ao Grupo III, observamos que as interfaces são muito parecidas como mencionado acima, com a conservação da maioria das interações. (Fig. 42). Ou seja, ocorre as mesmas formações de pontes salinas envolvendo Arg124, Glu119, Glu283 e Arg286 em ambas as estruturas, gerando uma aproximação das hélices $\alpha 2$ e um afastamento das hélices $\alpha 6$ quando comparada com a interface NC de SEPT3-GDP que estão mais compactas (forma fechada).

Figura 42: Interface NC de SEPT9 e SEPT2 com GDP. A) Interface de interação NC de SEPT9GC-GDP e SEPT2-GDP, para ambas estruturas a cadeia A está representada na cor ciano e a cadeia B na cor verde.

Fonte: Elaborada pela autora.

As tentativas de trabalhar com a construção do domínio da SEPT9 que inclui a região polibásica (hélice $\alpha 0$), denominado de SEPT9 $\alpha 0$, foram frustradas pela dificuldade em obter cristais. Por outro lado, a estrutura da SEPT3GC-GDP contém esta região (Macedo et al, resultados não publicados). Observa-se nesta estrutura, que a hélice $\alpha 0$ que apresentou densidade em um dos monômeros da unidade assimétrica, encontra-se parcialmente ordenada e exposta.

Observações semelhantes foram descritas para proteínas da família das Arfs (fator de ribosilação de ADP), que assim como septinas, também são GTPases envolvidas em remodelamento de membranas associados com transporte de vesículas intracelulares (D'SOUZA-SCHOREY; CHAVRIER, 2006; GILLINGHAM; MUNRO, 2007). Ambas proteínas apresentam uma α -hélice no N-terminal, que em septinas é denominada hélice $\alpha 0$, responsável pela associação com membranas (ZHANG et al., 1999a). A orientação dessa hélice nas Arfs depende do nucleotídeo ao qual encontra-se complexo, sendo sua atividade controlada pela hidrólise de GTP. Quando ligada a GDP a hélice fica encostada no domínio GTPase e quando ligada a GTP encontra-se exposta (CARLOS AMOR et al., 1994; GREASLEY et al., 1995; ANTONNY, B.; BÉRAUD-DU FOUR, S.; CHARDIN, P.; CHABRE, 1997; GOLDBERG, 1998; PASQUALATO; RENAULT; CHERFILS, 2002).

Tanto na estrutura de SEPT2-GDP quanto no complexo de septinas 2/6/7, a hélice $\alpha 0$ está presente, e em ambas estruturas a interface NC é aberta. Nestas estruturas as hélices $\alpha 0$ de

protômeros diferentes fazem parte das interações responsáveis por estabilizar a interface NC e sugere que tal interface necessita obrigatoriamente ser aberta afim de acomodar as hélices $\alpha 0$. Em uma interface fechada como vista para SEPT3-GDP as fitas- β 1, 3 e 2 causariam um impedimento estérico e forçariam a hélice $\alpha 0$ a sair da região da interface NC, como de fato foi visto na estrutura. Na figura 43, está apresentada a sobreposição da interface NC de SEPT3-GDP e SEPT2-GDP, onde é possível ver claramente tanto o impedimento estérico da hélice $\alpha 0$ na estrutura de SEPT2 com as fitas β 1, 2 e 3, como a hélice $\alpha 0$ da estrutura de SEPT3 desordenada em uma interface NC fechada. Embora estas observações não foram derivadas das estruturas inéditas apresentadas nesta tese, são pertinentes para a discussão da estrutura da SEPT9GC-GTP γ S que segue.

Figura 43: Sobreposição da interface NC de SEPT2-GDP (código 2QA5) e SEPT3-GDP (código 4Z54). SEPT2 encontra-se colorida em vermelho e SEPT3 em verde. Enquanto a hélice $\alpha 0$ se dobra para dentro da interface NC em SEPT2, em SEPT3 se encontra exposta.

Fonte : Elaborada pela autora.

5.3 Análise da estrutura de SEPT9GC-GTP γ S

A partir dos experimentos de *soaking*, foi possível obter um conjunto de dados de SEPT9GC complexado a GTP γ S. Os cristais de SEPT9GC complexados a GTP γ S pertencem ao grupo espacial $P2_1$, mesmo grupo espacial obtido para SEPT9GC-GDP (Tabela 9). No entanto, como se pode observar na tabela 9, os parâmetros da cela mudaram. Além disto, a unidade assimétrica da estrutura cristalina de SEPT9GC-GTP γ S é composta por 4 subunidades (Fig. 44), formada por dois dímeros do tipo G, diferindo assim do caso da SEPT9GC-GDP que é composta por apenas duas subunidades. Estas mudanças claramente são indícios de que a troca do GDP por GTP γ S induziu mudanças conformacionais na proteína e no seu empacotamento. O fato dos dois dímeros da unidade assimétrica aparentemente não fazerem contatos entre si, é consequência da região correspondente às fitas- β 7-10 ter densidade pobremente definida e não interpretável, embora tais contatos devam existir para estabilizar a rede cristalina. A maior desordem do cristal do complexo com GTP γ S é compatível com a mais baixa resolução desta estrutura (2.9 Å). As principais mudanças entre as duas estruturas, envolve a interface NC como será escrito abaixo.

Figura 44: Estrutura de SEPT9GC-GTP γ S. Quatro monômeros contidos na unidade assimétrica do cristal. O nucleotídeo GTP γ S está apresentado na estrutura na cor laranja.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com o intuito de confirmar a troca do nucleotídeo GDP por GTP γ S através do método de *soaking*, utilizou-se o conjunto de dados de SEPT9GC-GTP γ S para realizar um ciclo de refinamento onde o nucleotídeo GTP γ S foi substituído por GDP. Como mostra o mapa de densidade (Fig. 45), o nucleotídeo GDP não se encaixa perfeitamente no mapa, o qual sugere a ausência de átomos quando refinada com GDP, ou seja, um fosfato a mais seria necessário para modelar adequadamente o mapa. Este resultado mostra claramente que houve, de fato, uma troca de nucleotídeo durante o *soaking*. Embora surpreendentemente o cristal não tenha sido destruído durante este processo, a troca observada pode estar relacionada com o fato do análogo de GTP apresentar uma afinidade maior que GDP, como demonstrado pelos experimentos de ITC.

Figura 45: Mapa de densidade eletrônica calculadas com coeficientes $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ (azul) e $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ (verde) da estrutura de SEPT9GC-GTP γ S. A) Refinamento da estrutura com GTP γ S. B) Refinamento da estrutura com GDP. As regiões destacadas em vermelho correspondem a erros no refinamento. A densidade positiva no mapa (verde) corresponde a falta de átomos, indicativo da presença de um fosfato γ .

Fonte: Elaborada pela autora.

Um dos motivos que viabilizou essa troca do nucleotídeo dentro do cristal, permitindo o rearranjo da rede cristalina sem a sua destruição por completo, está relacionado ao empacotamento cristalino da estrutura de SEPT9GC-GDP. Ao gerar filamentos de SEPT9GC-GDP e SEPT3GC-GDP por simetria translacional, ou seja, por repetição da unidade assimétrica numa mesma direção (sem nenhuma rotação), observou-se que na estrutura de SEPT3-GDP os filamentos encontram-se mais compactos quando comparado com SEPT9GC-GDP onde estão mais soltos. A partir da estimativa da quantidade de solvente nas estruturas (valor calculado pelo coeficiente de Matthews) observou-se que a estrutura de SEPT9GC-GDP contém 49.99 % de solvente e a estrutura de SEPT3GC-GDP contém apenas 37.78 %. Consequentemente um monômero no cristal da SEPT9GC-GDP apresenta $574,5 \text{ \AA}^2$ da sua área superficial em contato com os seus vizinhos enquanto que em SEPT3-GDP este valor sobe para $1.140,2 \text{ \AA}^2$. Este fenômeno fica visível na Fig. 46 onde vários filamentos são mostrados em torno de um filamento central.

Como será descrito a seguir, a principal diferença entre o complexo da SEPT9 com GDP a GTP γ S é o encurtamento do filamento do último em relação ao primeiro. A partir do empacotamento mostrado na Fig. 46A é possível imaginar esta mudança acontecendo sem destruir a ordem do cristal.

Figura 46: Filamentos de SEPT9GC-GDP (código 5CY0) e SEPT3GC-GDP (código 4Z54) gerados por simetria cristalográfica. Na figura os filamentos estão representados saindo da página, e o leitor, portanto olhando ao longo do seu eixo principal. O filamento central está representado na cor azul e os filamentos em volta gerados por simetria na cor vermelho. Em ‘A’ está representado os filamentos SEPT9GC-GDP e em ‘B’ SEPT3GC-GDP.

Fonte: Elaborada pela autora.

No caso de SEPT3GC-GDP, essa diferença na quantidade de solvente gera um maior número de contatos da estrutura de SEPT3-GDP com resíduos dela mesma, certamente por essa razão os filamentos gerados encontram-se mais compactos. Na figura 47 é possível ver hélice $\alpha 0$ perfeitamente acomodada entre dois filamentos gerados, o que pode explicar o fato de estar ordenada na estrutura.

Figura 47: Empacotamento cristalino de SEPT3-GDP (código 4Z54) visto ao longo de duas direções perpendiculares (A e B). Um dos filamentos está destacado em cinza (representação de superfície) e os demais em vermelho. A hélice $\alpha 0$ (saindo do filamento cinza) está representada na cor amarelo e fica alojada entre subunidades de dois filamentos vermelhos.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.1 Interface G de SEPT9GC-GTP γ S

Na interface G da estrutura de SEPT9GC-GTP γ S, foram observadas pequenas diferenças em algumas regiões da estrutura quando comparada com SEPT9GC-GDP (Fig. 48). No entanto, tais mudanças parecem não ter alterado a interface G canônica observada em septinas (incluindo a interação entre o fosfato β e His145 da outra subunidade), mas apresentam mudanças conformacionais em consequência da presença do análogo de GTP.

As principais mudanças encontram-se nas regiões do P-loop e *Switch II*. Na região do *Switch II*, a Phe91 em ambas estruturas, apresenta a cadeia lateral em uma orientação diferente, o que pode ter gerado uma abertura do loop nessa região que se aproxima ao nucleotídeo no complexo com GTP γ S. Embora este movimento seja compatível com o mecanismo universal de pequenos GTPases, o fechamento aqui observado é apenas parcial (ver abaixo). Além disso, a hélice $\alpha 2$ ganhou uma volta a mais no seu N-terminal na estrutura complexada com GTP γ S. Tal fato, também já foi visto para outras estruturas de septina, como é o caso da estrutura de *SmSEPT10* complexada a GTP (código 4KVA), que também teve ganho de estrutura secundária quando comparada com *SmSEPT10* complexada a GDP (código 4KV9), o que sugere ser uma mudança comum.

Figura 48: Sobreposição dos monômeros de SEPT9 complexado a GDP e GTP γ S. As estruturas estão representadas na cor ciano para a forma complexada a GDP e em amarelo para a forma complexada a GTP γ S. Destacadas em caixas encontram-se as regiões que apresentam diferenças

Fonte: Elaborada pela autora.

Na região do P-loop observa-se um deslocamento de cerca de 1.4 Å causado pela presença do nucleotídeo GTP γ S. Nesse análogo de GTP, uma das hidroxilas do fosfato γ é substituído por um átomo de enxofre (S) que possui número atômico 16 comparado com 8 no caso de oxigênio. Consequentemente, o átomo de enxofre (S, raio de Vander Der Walls 1.8 Å) apresenta um volume atômico maior que o oxigênio (O, raio de Van Der Walls 1.5 Å), necessitando assim, de mais espaço para sua acomodação na estrutura o que pode ter causado o deslocamento do loop (Fig. 49).

Figura 49: Sobreposição da região do P-loop das estruturas de SEPT9GC-GTP γ S e SEPT9GC-GDP. Em A e B respectivamente estão representados os nucleotídeos GTP γ S e GDP em esferas. Em ambos, o P-loop está representado em amarelo (complexo com GTP γ S) e azul (com GDP).

Fonte: Elaborada pela autora.

O mecanismo universal das pequenas GTPases prevê que no complexo da SEPT9 com GTP, o fosfato γ estaria ligado ao grupo amida da Thr64 do *Switch I* e Gly90 do *Switch II* (ZENT; WITTINGHOFFER, 2014). Isto acontece devido a mudanças conformacionais dos *switches I* e *II* em passar do estado complexado a GTP para o estado complexado a GDP (VETTER, 2001). Em todas as estruturas de septinas complexadas a GTP que possuem a Thr catalítica (como exemplo SEPT2 e SEPT3), essas interações são vistas (MACEDO et al., 2013)(SIRAJUDDIN et al., 2009) (Fig. 50A). No entanto, na estrutura de SEPT9GC complexada a GTP γ S a presença do átomo de enxofre no fosfato γ comprometeu algumas destas interações levando a um fechamento apenas parcial dos *switches*. Como se pode observar na figura 50B, o fosfato γ se liga apenas à cadeia lateral da Thr64, perdendo assim uma ligação com a Gly90 do *Switch II* e a ligação de hidrogênio com a amida da Thr64. Como o átomo de enxofre possui eletronegatividade menor que a do oxigênio, é justificável a perda da interação com a Ser32 vista nas estruturas de SEPT2 e SEPT3 complexadas a GppNHp (Fig. 50).

Figura 50: Resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação do nucleotídeo via fosfato γ no caso de SEPT3GC complexado a GppNHP (A) e SEPT9GC complexado a GTP γ S (B).

Fonte: Adaptada pela autora.

No entanto, apesar das mudanças na interface G observadas na estrutura de SEPT9GC-GTP γ S, a mesma não se mostrou diferente de uma interface canônica. Septinas, assim como as proteínas G, também mudam as regiões dos *Switchs* dependendo da natureza do nucleotídeo ao qual encontra-se ligado. Quando ligada a GTP, o fosfato γ induz principalmente mudanças conformacionais nas regiões dos *Switchs* I e II (VETTER, 2001), assim como está sendo visto nas estruturas de SEPT9 complexada a GTP γ S e GDP. Acredita-se que essa região do *Switch* II, provavelmente tenha pouca contribuição para a estabilização da interface G e apresenta baixa estabilidade quando ligada a GTP. Isso torna os filamentos de septinas mais dinâmicos, levando à dissociação e rearranjo de complexos, assim como, a construção de estruturas de ordem superior (ZENT; WITTINGHOFFER, 2014b)

Por outro lado, os *switches* I e II não se alteram de conformação tão drasticamente em SEPT9 comparado com outras pequenas GTPases, incluindo outras septinas. Muitas vezes os *switches* apresentam desordem na presença de GDP e somente se tornam estruturados na forma do complexo com GTP. Porém, como descrito anteriormente, no caso da SEPT9 os *switches* estão totalmente ordenados em ambos os complexos. Atribuímos este fenômeno à presença do íon Mg^{2+} tanto no complexo com GDP quanto com GTP γ S.

Na estrutura de SEPT9GC-GTP γ S, os resíduos envolvidos na coordenação do íon Mg $^{2+}$ são os mesmos que estão envolvidos na estrutura de SEPT9GC-GDP (Fig. 51). Porém, devido à baixa resolução da estrutura de SEPT9GC-GTP γ S não foi possível identificar com segurança moléculas de água. Além disto, o fosfato adicional do GTP γ S (fosfato- γ) também participa da coordenação, substituindo uma molécula de água encontrada na estrutura com GDP. Assim, o íon Mg $^{2+}$ na estrutura complexada a GTP γ S é coordenado pelo fosfato- β e γ , Ser37, Thr64 e Asp87. A presença do Mg $^{2+}$, portanto, parece fundamental para a estruturação dos *switches*.

Figura 51: Resíduos de aminoácidos envolvidos na coordenação do íon Mg $^{2+}$ na estrutura de SEPT9GC-GTP γ S. O íon Mg $^{2+}$ está representado em verde.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.2 Interface NC

Ao compararmos as estruturas dos complexos da SEPT9 com GDP e GTP γ S as diferenças mais interessantes e fisiologicamente relevantes foram encontradas na interface NC.

Como já descrito acima, a forma cristalográfica da SEPT9GC complexada a GTP γ S é composto por 4 subunidades na unidade assimétrica, sendo necessário assim, uma comparação das interfaces NC geradas por ambos os dímeros, afim de avaliar se o empacotamento cristalino dos filamentos são iguais. Isso porque a troca do nucleotídeo gerou um rearranjo na estrutura de SEPT9GC complexada a GTP γ S.

Na figura 52, está apresentada a sobreposição das interfaces NC cristalograficamente independentes de SEPT9GTP γ S, e como se pode observar as interfaces NC se sobrepoem bem, indicando que não há diferenças significativas devido ao empacotamento cristalino e portanto, provavelmente a estrutura é um reflexo verdadeiro da situação fisiológica.

Figura 52: Sobreposição dos dois dímeros da unidade assimétrica em torno da interface NC de SEPT9GC-GTP γ S. Os dímeros são diferenciadas na figura por cores, onde a interface NC gerada por um dos dímeros (cadeia A e B) está representada na cor verde e a do outro dímero (cadeia C e D) na cor amarelo. Um monômero de cada dímero está representado do lado esquerdo da figura e o outro do lado direito. Hélices $\alpha 2$ e $\alpha 6$ são indicadas explicitamente para facilitar compreensão.

Fonte: Elaborada pela autora.

No entanto, ao se comparar as interfaces NC de SEPT9GC-GDP com SEPT9GC-GTP γ S, observa-se que as interfaces são diferentes (Fig. 53). O loop entre $\alpha 2$ e $\beta 4$ que contém a Arg124 parece agora ter uma conformação semelhante à da estrutura de SEPT3 complexada a GDP e GppNHP, ou seja, apresenta uma interface NC fechada, com o loop "abraçando" a hélice $\alpha 6$. Como é típico para a interface fechada as hélices $\alpha 6$ dos dois monômeros se aproximam e as hélices $\alpha 2$ se afastam.

Figura 53: Sobreposição das dimeros de SEPT9GC-GDP e SEPT9GC-GTP γ S em torno da interface NC. A estrutura de SEPT9GC complexada com GDP está representada na cor ciano e a estrutura complexada a GTP γ S em amarelo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Esta observação sugere que a natureza do nucleotídeo ligado a SEPT9 influencia as interações na interface NC de forma a encurtar o filamento no caso do complexo com GTP e alongar no complexo com GDP, em função do fechamento e abertura da interface NC respectivamente (Fig 54). Porém, é necessário ter cautela na interpretação das estruturas porque o mesmo fenômeno não é visto no caso da SEPT3, onde tanto a estrutura com GDP quanto com GppNHp, estão na forma fechada.

Figura 54: Homofilamentos de SEPT9 observada no cristal. A) Homofilamento de SEPT9 complexada com GDP, onde é possível observar uma interface NC aberta. B) Homofilamento de SEPT9 complexada com GTP γ S, onde é possível observar uma interface NC apertada quando comparada com SEPT9-GDP.

Fonte: Elaborada pela autora.

Vale ressaltar, que surgiu também a possibilidade de que, na verdade, existiam duas formas cristalinas diferentes para o complexo com GDP (uma com a interface aberta e a outra com a interface fechada) e que por acaso, os cristais selecionados para a coleta de dados (tanto a 2.7 quanto 2.1 Å) eram da mesma forma (aberta). Se tal especulação fosse verdade, a interface fechada poderia existir também no caso do complexo com GDP indicando que não há uma diferença intrínseca na estrutura dependente do tipo de nucleotídeo. Para testar esta hipótese foram selecionados mais 12 cristais da SEPT9GC-GDP de gotas de cristalização diferentes e os parâmetros de cela foram determinados em todos os casos. Sem exceção, todos os cristais apresentaram a cela correspondente a estrutura aberta, sugerindo a existência de apenas uma forma cristalina para SEPT9GC-GDP e que esta é diferente da forma obtida para SEPT9GC-GTP γ S após o experimento de *soaking*. As evidências, portanto, sugerem que há uma mudança conformacional que afeta a interface NC em função da hidrólise do GTP para gerar GDP e que esta mudança conformacional envolve a aproximação e afastamento das subunidades na interface NC.

Apesar da interface NC de SEPT9GC-GTP γ S ser fechada como em SEPT3-GppNHP, as interações que estabilizam essa interface não são exatamente as mesmas. Em SEPT3 a interação entre os protômeros se dá através das regiões carregadas como já descrito no item 5.2.2 (Fig. 37). Já na estrutura de SEPT9 complexada a GTP γ S, devido a baixa resolução, não foi possível analisar com detalhes os resíduos responsáveis pelas principais interações na interface NC vistas nas estruturas de SEPT2-GDP e SEPT9-GDP. Devido às limitações da resolução baixa, muitas das cadeias laterais não podem ser orientadas sem ambiguidade. Portanto, embora a aproximação dos monômeros seja clara, se os detalhes das interações entre as regiões carregadas no final da hélice $\alpha 2$ e a hélice $\alpha 5'$ são idênticos ou não, ainda não pode ser afirmado.

Porém uma observação que merece comentário é que, ao fechar a interface em um dos dímeros (cadeia A e B), a Arg127 se dobra para dentro da estrutura, apontando na direção da carbonila da Ser279 do aneurisma da hélice $\alpha 6$ da outra subunidade (Fig. 55A). No outro dímero (cadeia C e D), Arg124 cumpre o mesmo papel. (Fig. 55B). Apesar de não observar uma interação direta entre os resíduos citados, devido a distância entre eles que está em torno de 4.3 Å (cadeia A e B) e 3.8 Å (cadeia C e D), talvez essas interações pudessem ser mediadas por ligações de hidrogênio envolvendo uma molécula de água.

Esta observação nos parece interessante uma vez que o α -aneurisma da hélice $\alpha 6$ é uma irregularidade estrutural da hélice que é conservado em todas as estruturas de septinas resolvidas até o momento. Um α -aneurisma surge como consequência de uma perda do padrão normal de ligações de hidrogênio de uma hélice- α levando ao aparecimento de uma volta de hélice- π e consequentemente uma saliência na estrutura. No caso da hélice $\alpha 6$ das septinas, especificamente a consequência do aneurisma é de deixar o grupo carbonila da Ser279 (no meio da hélice) livre, sem formar nenhuma ligação de hidrogênio, e apontando para a interface NC. Até agora não foi apresentada nenhuma justificativa para tal estrutura. As observações apresentadas aqui, embora provisórias, sugerem que a disponibilidade do grupo carbonila da Ser279 pode ser relevante para estabilizar a interface na sua forma fechada.

Figura 55: Representação das duas interfaces NC de SEPT9GC complexada a GTP γ S.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.4 Mudanças estruturais

O experimento de *soaking* de um cristal da SEPT9GC-GDP com GTP γ S resultou numa alteração significativa da rede cristalina, sugerindo que a troca do nucleotídeo era suficiente para superar as forças de empacotamento. Este resultado, por si só, sugere que a estrutura com a interface fechada complexada com GTP γ S não é um artefato de cristalização, indicando que as duas formas cristalinas reportadas nesta tese revelam que SEPT9 tem duas formas fisiológicas relevantes. Os dados, portanto, sugerem que a interface NC abre e fecha dependendo do nucleotídeo presente e portanto, provavelmente durante o ciclo de hidrólise de GTP.

A formação de um filamento a partir de protofilamentos octaméricos é feita justamente via esta interface envolvendo uma interação entre duas cópias da SEPT9 (Fig. 56A). Neste momento, ao polimerizar, imagina-se que a SEPT9 estaria saturada com GTP devido a sua alta concentração intracelular comparado com GDP. O processo de polimerização, portanto, dependeria criticamente da formação do contato entre duas cópias de SEPT9-GTP de forma fidedigna. Tanto a SEPT9 quanto SEPT3 quando ligadas a GTP apresentam a interface NC fechada e uma vez que esta conformação só foi vista em septinas deste grupo, é provável que seja a chave para garantir a formação correta da interface e portanto o polímero. Baseado na

estrutura da SEPT3-GDP podemos concluir que estas interações incluem pontes salinas e interações coulombicas provenientes de regiões altamente carregadas que incluem a hélice $\alpha 5'$ que apresenta uma orientação única neste grupo de septinas. A natureza das interações entre subunidades envolvendo muitos grupos carregados pode explicar o porque desta interface ser sensível a altas concentrações de sal.

Figura 56: Proposta de polimerização de um filamento de septinas baseado em octâmeros. A) Heterofilamento formado por um representante de cada grupo (mostrado em cores), destacando a interface NC de SEPT9 como essencial para a polimerização do filamento. B) Disposição da hélice $\alpha 0$ em uma interface NC de SEPT9 dependendo do nucleotídeo ao qual encontra-se ligado. Em uma interface NC com duas SEPT9 complexada a GTP, a interface NC é apertada com a hélice $\alpha 0$ exposta para fora, a qual estaria disponível para interagir com a membrana celular. Após a hidrólise do GTP e formação de GDP, a interface NC do filamento se abre para acomodar a hélice $\alpha 0$ dentro da interface.

Fonte: Elaborada pela autora.

A formação do contato entre duas cópias de SEPT9 carreando GTP seria seguida por hidrólise, e consequentemente formação de GDP e abertura da interface. Baseado no raciocínio apresentado nesta tese, espera-se que a hélice $\alpha 0$ esteja exposta quando a SEPT9 estiver complexada com GTP devido a interface fechada causar impedimentos estéricos. Por outro lado, ao hidrolisar o GTP e abrir a interface é possível inferir, por analogia com a SEPT2, que a hélice $\alpha 0$ entraria para dentro da interface NC (Fig. 56B).

Portanto, sugerimos que uma das consequências de abrir e fechar a interface NC esteja relacionada com o grau de exposição da hélice α_0 , uma vez que é sabido que esta hélice corresponde a região polibásica, importante para interagir com membranas celulares. Assim, o mecanismo aqui proposto pode ter consequências importantes para a maneira com que o filamento se associa e desassocia de membranas em função da hidrólise de GTP.

A ligação e hidrólise de GTP acontecem na interface G. Por outro lado, observamos mudanças drásticas na interface NC em função do tipo de nucleotídeo ligado. Isto sugere que deve haver um mecanismo de comunicação entre as interfaces ao longo do filamento de tal forma que a troca de GTP por GDP seja transmitida de um lado do monômero para o outro. Um possível mecanismo, envolvendo o deslizamento de fitas- β já foi descrito em SEPT10 de *Schistosoma mansoni*, porém isto não foi visto em SEPT9.

A alta resolução de SEPT9GC-GDP permitiu a descrição detalhada da estrutura toda, inclusive a fita β_2 , situada na extremidade da folha- β , a única antiparalela em relação as demais fitas. Esta fita frequentemente apresenta densidade difusa e fica até difícil interpretá-la com confiança em termos da parte da sequência de aminoácidos que a compõe. Por outro lado as duas estruturas de alta resolução para *Sm*SEPT10 complexada a GDP e GTP permitiram identificar que há um claro deslizamento da fita β_3 em relação as fitas adjacentes (β_1 e β_2) em função do nucleotídeo presente (ZERAİK et al., 2014). No entanto, esse deslizamento não foi observado quando comparadas as estruturas de SEPT9GC complexadas a GDP e GTP γ S (Fig. 57).

Figura 57: Sobreposição das fitas- β (1, 2 e 3) das estruturas de SEPT9GC ligadas a GDP e GTP γ S. A estrutura de SEPT9GC-GDP está representada na cor ciano e a estrutura de SEPT9GC- GTP γ S na cor salmão.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como se pode observar na figura 57, as fitas $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$ das estruturas de SEPT9GC complexadas a GDP e GTP γ S se sobrepõem tanto em termos de estrutura quanto sequência. Tal evidência pode estar relacionada a presença do íon Mg^{2+} , presente em ambas as estruturas de SEPT9, uma vez que foi descrito para *Sm*SEPT10 que a ausência do íon Mg^{2+} na estrutura complexada a GDP e a presença do mesmo na estrutura complexada a GTP parece ter sido essencial para o deslizamento das fitas. Como os resíduos provenientes da fita $\beta 3$ são importantes para a coordenação do íon, é possível que a sua presença em ambos os complexos da SEPT9 impeça o movimento da mesma. Ensaios de cristalização de SEPT9GC-GDP na ausência de Mg^{2+} estão sendo realizadas, afim de verificar se há ou não deslizamento na fita $\beta 3$ em função do tipo de nucleotídeo presente, assim como visto para a estrutura de *Sm*SEPT10-GDP (ZERAİK et al., 2014). Ainda não houve sucesso em obter tais cristais.

É interessante notar que o deslizamento da fita $\beta 3$ como visto no complexo da *Sm*SEPT10-GTP também levaria a um impedimento estérico com a hélice $\alpha 0$, deslocando-a da interface NC. Portanto, se houver deslizamento da fita em SEPT9 isto poderia representar mais um mecanismo que age em conjunto com o fechamento da interface como um todo. Por outro lado, as estruturas apresentadas aqui sugerem que talvez existam outros mecanismos de comunicação entre interfaces adjacentes. Embora não tenha sido possível desvendar detalhes de tais eventuais mecanismos, são notáveis as diferenças encontradas tanto no N- quanto no C-terminal da hélice $\alpha 2$ (Fig. 48). Isto sugere que esta hélice poderia ter um papel neste processo, uma vez que a hélice atravessa o monômero com seu N-terminal próximo da interface G e o C-terminal fazendo parte da interface NC. O mecanismo poderia envolver a reorientação da cadeia lateral da Phe61 como descrito acima (Fig. 48).

O rearranjo da interface NC observado aqui pode ter implicações para a interação do filamento com a membrana, comentado acima, e também para a própria montagem do filamento. Embora ainda não totalmente esclarecido em termos de mecanismo, estudos com septinas de levedura e humanas indicam a importância da ligação e hidrólise de GTP para a formação de filamentos (VERSELE; THORNER, 2004; WEEMS et al., 2014; ZENT; WITTINGHOFER, 2014a; KUO et al., 2015). É possível que as mudanças na interface NC observadas aqui sejam importantes para o controle da montagem e desmontagem do filamento *in vivo*, além da sua interação com membranas.

6.0 CONCLUSÕES

Todos os complexos alvo do projeto foram clonados com sucesso, sendo possível apenas a validação do complexo tetramérico SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9, o qual foi identificado por espectrometria de massas. No entanto, ainda não obtivemos cristais do mesmo.

Os estudos biofísicos para SEPT9GC foram realizados com sucesso, obtendo-se um protocolo padronizado de expressão, purificação e caracterização. Os resultados reportados nessa tese estão de acordo com os já apresentados na literatura para SEPT3 que é uma representante do mesmo grupo de SEPT9 (Grupo I). Ou seja, esses dois representantes do Grupo I de septinas possuem características similares quanto ao estado oligomérico, atividade GTPase e afinidade pelos nucleotídeos de guanina.

As estruturas cristalográficas de SEPT9GC complexadas com dois ligantes diferentes (GDP e GTP γ S), nos permitiu avaliar propriedades até então desconhecidas como a caracterização da interface NC de SEPT9. A alta resolução de SEPT9GC-GDP mostrou densidade eletrônica em algumas regiões que até então não haviam sido vistas em outras estruturas de septinas, contribuindo assim, significativamente para a análise da estrutura. Além disto, é a primeira vez que temos em mãos estruturas de boa resolução para dois membros do mesmo grupo das septinas humanas (Grupo I), permitindo testar hipótese levantadas até o momento, baseado em apenas uma única estrutura de cada grupo.

Curiosamente as septinas 3 e 9, apesar de possuírem características biofísicas similares ao grupo que pertencem, estruturalmente apresentaram-se bastante diferentes em relação a interface NC, que é responsável pela formação de filamentos.

Os resultados da estrutura de SEPT9GC complexada a GTP γ S, mostram que houve uma mudança conformacional na proteína devido a troca do nucleotídeo utilizando o método de *soaking*. Tal troca, parece ter sido possível devido ao empacotamento dos filamentos mais soltos na estrutura SEPT9, não rompendo assim, a rede cristalina do cristal, mas levando a um pequeno rearranjo que resultou em uma mudança na cela unitária.

A plasticidade na interface NC de SEPT9 complexada a GDP e GTP γ S parece que está relacionada com o grau de exposição da hélice α_0 , região polibásica, importante para interagir com membranas celulares.

Mudanças estruturais na fita β_3 com SEPT9 complexada a GDP e GTP γ S, não foram vistas. Tal evidência parece ser devido a presença do íon Mg²⁺, uma vez que os resíduos

provenientes da fita $\beta 3$ são importantes para a coordenação do íon. Com isso, é possível que a presença do íon em ambos os complexos das estruturas de SEPT9 impeça o movimento da fita. Porém, deve haver uma comunicação entre as interfaces, uma vez que observou-se que a natureza do nucleotídeo na interface G influenciou a conformação na interface NC. Ou seja, mesmo não observando o deslizamento da fita $\beta 3$, a aproximação das subunidades na interface NC na forma fechada, já é suficiente para expulsar a hélice $\alpha 0$ da interface.

Embora ainda não esteja claro o mecanismo de comunicação entre a interface G e NC, as mudanças observadas no N- e C-terminal da hélice $\alpha 2$ sugerem que esta hélice poderia ter um papel neste processo, uma vez que essa hélice atravessa o monômero com seu N- e C-terminal.

7.0 REFERÊNCIAS

- ANTONNY, B.; BÉRAUD-DU FOUR, S.; CHARDIN, P.; CHABRE, M. N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. **Biochemistry**, v. 36, n. 15, p. 4675–4684, 1997.
- BAI, X.; BOWEN, J. R.; KNOX, T. K.; ZHOU, K.; PENDZIWIAT, M.; KUHLENBÄUMER, G.; SINDELAR, C. V.; SPILIOTIS, E. T. Novel septin 9 repeat motifs altered in neuralgic amyotrophy bind and bundle microtubules. **The Journal of Cell Biology**, v. 203, n. 6, p. 895–905, 2013.
- BEISE, N.; TRIMBLE, W. Septins at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 24, p. 4141–4146, 2011.
- BERTIN, A.; MCMURRAY, M. A.; GROB, P.; PARK, S.-S.; GARCIA, G.; PATANWALA, I.; NG, H. -I.; ALBER, T.; THORNER, J.; NOGALES, E. Saccharomyces cerevisiae septins: Supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 24, p. 8274–8279, 2008.
- BIOSCIENCE, B. **BD TALON™ metal affinity resins user manual. 2003**. Disponível em: <http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Tag_Protein_Purification/Ni_NTA/CLONTECH_TalonUserManual.pdf>. Acesso em: 11 maio 2016.
- BOURNE, H. R.; SANDERS, D. A.; MCCORMICK, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. **Nature**, v. 349, n. 6305, p. 117–127, 1991.
- BURROWS, J. F.; CHANDULOY, S.; MCILHATTON, M. A.; NAGAR, H.; YEATES, K.; DONAGHY, P.; PRICE, J.; GODWIN, A. K.; JOHNSTON, P. G.; RUSSELL, S. H. Altered expression of the septin gene, SEPT9, in ovarian neoplasia. **The Journal of Pathology**, v. 201, n. 4, p. 581–588, 2003.
- BYERS, B.; GOETSCH, L. HIGHLY ORDERED RING OF MEMBRANE-ASSOCIATED FILAMENTS IN BUDDING YEAST. **Journal of Cell Biology**, v. 69, n. 3, p. 717–721, 1976.
- CAO, L.; YU, W.; WU, Y.; YU, L. The evolution, complex structures and function of septin proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 20, p. 3309–3323, 2009.
- CARLOS AMOR, J.; HARRISON, D. H.; KAHN, R. A.; RINGE, D. Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP. **Nature**, v. 372, n. 6507, p. 704–708, 1994.
- CASAMAYOR, A.; SNYDER, M. Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and function. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 8, p. 2762–2777, 2003.
- CERVEIRA, N.; CORREIA, C.; BIZARRO, S.; PINTO, C.; LISBOA, S.; MARIZ, J. M.; MARQUES, M.; TEIXEIRA, M. R. SEPT2 is a new fusion partner of MLL in acute myeloid leukemia with t(2;11)(q37;q23). **Oncogene**, v. 25, n. 45, p. 6147–6152, 2006.
- COMPTON, L. A.; JOHNSON, W. C. Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. **Analytical Biochemistry**, v. 155, n. 1, p. 155–167, 1986.
- CONNOLLY, D.; HOANG, H. G.; ADLER, E.; TAZEARSAN, C.; SIMMONS, N.; BERNARD, V. V.; CASTALDI, M.; OKTAY, M. H.; MONTAGNA, C. Septin 9

amplification and isoform-specific expression in peritumoral and tumor breast tissue. **Biological Chemistry**, v. 395, n. 2, p. 157–67, 2014.

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

D'SOUZA-SCHOREY, C.; CHAVRIER, P. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 5, p. 347–358, 2006.

DAMALIO, J. C. P. **Estudos bioquímicos, funcionais e estruturais de septina humana sept2: fatores que determinam a formação de agregados**. 2011. 211 f. Tese (Doutorado em Física Biomolecular) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos 2011.

DELANO, W. L. **The PyMOL molecular graphics system: version 1.2002**. Disponível em: <Dispon?ve wm: < <http://www.pymol.org>>. Acesso em: 20 de Janeiro. 2016.>. Acesso em: 20 jan. 2016.

DEMARINI, D. J.; ADAMS, A. E. M.; FARES, H.; VIRGILIO, C. De; VALLE, G.; CHUANG, J. S.; PRINGLE, J. R. A Septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the *saccharomyces cerevisiae* cell wall. **The Journal of Cell Biology**, v. 139, n. 1, p. 75–93, 1997.

DIDOMENICO, B.; BROWN, N.; LUPISELLA, J.; GREENE, J.; YANKO, M.; KOLTIN, Y. Homologs of the yeast neck filament associated genes: isolation and sequence analysis of *Candida albicans* CDC3 and CDC10. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 242, n. 6, p. 689–698, 1994.

DREES, B. L.; SUNDIN, B.; BRAZEAU, E.; CAVISTON, J. P.; CHEN, G.-C.; GUO, W.; KOZMINSKI, K. G.; LAU, M. W.; MOSKOW, J. J.; TONG, A.; SCHENKMAN, L. R.; MCKENZIE, A.; BRENNWALD, P.; LONGTINE, M.; BI, E.; CHAN, C.; NOVICK, P.; BOONE, C.; PRINGLE, J. R.; DAVIS, T. N.; FIELDS, S.; DRUBIN, D. G. A protein interaction map for cell polarity development. **The Journal of Cell Biology**, v. 154, n. 3, p. 549–576, 2001.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 60, n. 12, p. 2126–2132, 2004.

ESTEY, M. P.; KIM, M. S.; TRIMBLE, W. S. Septins. **Current Biology**, v. 21, n. 10, p. 384–387, 2011.

FARKASOVSKY, M.; HERTER, P.; VOS, B.; WITTINGHOFER, A. Nucleotide binding and filament assembly of recombinant yeast septin complexes. **Biological Chemistry**, v. 386, n. 7, p. 642–654, 2005.

FIELD, C. M. A purified *Drosophila* septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity. **The Journal of Cell Biology**, v. 133, n. 3, p. 605–616, 1996.

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

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

FRAZIER, J. A.; WONG, M. L.; LONGTINE, M. S.; PRINGLE, J. R.; MANN, M.; MITCHISON, T. J.; FIELD, C. Polymerization of purified yeast septins: evidence that organized filament arrays may not be required for septin function. **The Journal of Cell Biology**, v. 143, n. 3, p. 737–749, 2 nov. 1998.

FÜCHTBAUER, A.; LASSEN, L. B.; JENSEN, A. B.; HOWARD, J.; QUIROGA, A. de S.; WARMING, S.; SØRENSEN, A. B.; PEDERSEN, F. S.; FÜCHTBAUER, E.-M. Septin9 is involved in septin filament formation and cellular stability. **Biological Chemistry**, v. 392, n. 8-9, p. 769–777, 2011.

FUJISHIMA, K.; KIYONARI, H.; KURISU, J.; HIRANO, T.; KENGAKU, M. Targeted disruption of Sept3, a heteromeric assembly partner of Sept5 and Sept7 in axons, has no effect on developing CNS neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 102, n. 1, p. 77–92, 2007.

GARCIA, W.; DE ARAÚJO, A. P. U.; DE OLIVEIRA NETO, M.; BALLESTERO, M. R. M.; POLIKARPOV, I.; TANAKA, M.; TANAKA, T.; GARRATT, R. C. Dissection of a human septin: definition and characterization of distinct domains within human SEPT4. **Biochemistry**, v. 45, n. 46, p. 13918–13931, 2006a.

GARCIA, W.; DE ARAÚJO, A. P. U.; LARA, F.; FOGUEL, D.; TANAKA, M.; TANAKA, T.; GARRATT, R. C. An intermediate structure in the thermal unfolding of the GTPase domain of human septin 4 (SEPT4/Bradeion- β) forms amyloid-like filaments in vitro. **Biochemistry**, v. 46, n. 39, p. 11101–11109, 2007.

GASTEIGER E., HOOGLAND C., GATTIKER A., DUVAUD S., WILKINS M.R., APPEL R.D., B. A. Protein identification and analysis tools on the expasy server. In: WALKER, John M. (Ed.). **The proteomics protocols handbook**. 2005.

GIACOVAZZO, C.; MONACO, H. L.; VITERBO, D.; SCORDARI, F.; GILLI, G.; ZANOTTI, G.; CATTI, M.; GIACOVAZZO, C.; PAUFLER, P. Cover Picture: Cryst. Res. Technol. 4/2012. **Crystal Research and Technology**, v. 47, n. 4, p. n/a–n/a, abr. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/crat.201290004>>.

GILLINGHAM, A. K.; MUNRO, S. The small G proteins of the Arf family and their regulators. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 23, n. 1, p. 579–611, 2007.

GLADFELTER, A. S.; PRINGLE, J. R.; LEW, D. J. The septin cortex at the yeast mother – bud neck. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 6, p. 681–689, 2001.

GOLDBERG, J. Structural basis for activation of ARF GTPase. **Cell**, v. 95, n. 2, p. 237–248, 1998.

GREASLEY, S. E.; JHOTI, H.; TEAHAN, C.; SOLARI, R.; FENSOME, A.; THOMAS, G. M. H.; COCKCROFT, S.; BAX, B. The structure of rat ADP-ribosylation factor-1 (ARF-1) complexed to GDP determined from two different crystal forms. **Nature Structural Biology**, v. 2, n. 9, p. 797–806, 1995.

HAARER, B. K.; PRINGLE, J. R. Immunofluorescence localization of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. **Molecular and Cellular Biology**, v. 7, n. 10, p. 3678–3687, 1987.

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

HALL, P. A.; RUSSELL, S. E. H.; PRINGLE, J. R. An introduction to the septins. In: **The septins**. Chichester: John Wiley, & Sons, 2008. p. 1–4.

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

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

HARTWELL, L. H.; CULOTTI, J.; REID, B. Genetic control of the cell-division cycle in yeast I. detection of mutants. **Proceedings of the National Academy**, v. 66, n. 2, p. 352–359, 1970.

HARTWELL, L. H. **Genetic control of the cell-division cycle in yeast iv. genes controlling bud emergence and cytokinesis**. [s.l.: s.n.]v. 69

HARTWELL, L. H.; CULOTTI, J.; PRINGLE, J. R.; REID, B. J. Genetic control of the cell division cycle in yeast: A model to account for the order of cell cycle events is deduced from the phenotypes of yeast mutants. **Science**, v. 183, n. 4120, p. 46–51, 1974.

HSU, S. C.; HAZUKA, C. D.; ROTH, R.; FOLETTI, D. L.; HEUSER, J.; SCHELLER, R. H. Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments. **Neuron**, v. 20, n. 6, p. 1111–1122, 1998.

HUANG, Y.-W.; SURKA, M. C.; REYNAUD, D.; PACE-ASCIAK, C.; TRIMBLE, W. S. GTP binding and hydrolysis kinetics of human septin 2. **FEBS Journal**, v. 273, n. 14, p. 3248–3260, 2006.

HYONG, B. K.; BRIAN, K. K.; PRINGLE, J. R. Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: Localization of the CDC3 gene product and the timing of events at the budding site. **Journal of Cell Biology**, v. 112, n. 4, p. 535–544, 1991.

IHARA, M.; KINOSHITA, A.; YAMADA, S.; TANAKA, H.; TANIGAKI, A.; KITANO, A.; GOTO, M.; OKUBO, K.; NISHIYAMA, H.; OGAWA, O.; TAKAHASHI, 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, n. 3, p. 343–352, 2005.

IHARA, M.; TOMIMOTO, H.; KITAYAMA, H.; MORIOKA, Y.; AKIGUCHI, I.; SHIBASAKI, H.; NODA, M.; KINOSHITA, M. Association of the cytoskeletal GTP-binding protein Sept4/H5 with cytoplasmic inclusions found in parkinson's disease and other synucleinopathies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 26, p. 24095–24102, 2003.

IRAZOQUI, J. E. Polarity establishment in yeast. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 11, p. 2169–2171, 2004.

JOHN, C. M.; HITE, R. K.; WEIRICH, C. S.; FITZGERALD, D. J.; JAWHARI, H.; FATY, M.; SCHLÄPFER, D.; KROSCHEWSKI, R.; WINKLER, F. K.; WALZ, T.; BARRAL, Y.; STEINMETZ, M. O. The *Caenorhabditis elegans* septin complex is nonpolar. **The EMBO Journal**, v. 26, n. 14, p. 3296–3307, 2007.

JOHN, J.; RENSLAND, H.; SCHLICHTING, I.; VETTER, I.; BORASIO, G. D.; GOODY, R. S.; WITTINGHOFER, A. Kinetic and structural analysis of the Mg²⁺-binding site of the guanine nucleotide-binding protein p21H-ras. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 2, p. 923–929, 1993.

KABSCH, W. X. Optimum solubility (OS) screening: an efficient method to optimize buffer conditions for homogeneity and crystallization of proteins. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 66, p. 125–132, 2010.

KALIKIN, L. M.; SIMS, H. L.; PETTY, E. M. Genomic and expression analyses of alternatively spliced transcripts of the MLL septin-like fusion gene (MSF) that map to a 17q25 region of loss in breast and ovarian Tumors. **Genomics**, v. 63, n. 2, p. 165–172, 2000.

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

KEIICHI SAKAI, MASANORI KURIMOTO, ATSUSHI TSUGU, SHERRI L. HUBBARD, WILLIAM S. TRIMBLE, J. T. R. Expression of Nedd5, a mammalian septin, in human brain tumors. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 57, n. 3, p. 169–177, 2002.

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

KIM, M. S.; FROESE, C. D.; ESTEY, M. P.; TRIMBLE, W. S. SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission. **The Journal of Cell Biology**, v. 195, n. 5, p. 815–826, 2011.

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. **The American Journal of Pathology**, v. 153, n. 5, p. 1551–1560, 1998.

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

KINOSHITA, M.; KUMAR, S.; MIZOGUCHI, A.; IDE, C.; KINOSHITA, A.; HARAGUCHI, T.; HIRAOA, Y.; NODA, M. Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. **Genes & Development**, v. 11, n. 12, p. 1535–1547, 1997.

KISSEL, H.; GEORGESCU, M.-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, n. 3, p. 353–364, 2005.

KREMER, B. E.; ADANG, L. A.; MACARA, I. G. Septins regulate actin organization and cell-cycle arrest through nuclear accumulation of NCK mediated by SOCS7. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 837–850, 2007.

KUO, Y.; HUANG, H.; CAI, T.; WANG, T. Target of rapamycin complex 2 regulates cell growth via myc in Drosophila. **Scientific Reports**, v. 5, p. 10339, 2015.

KUO, Y.-C.; SHEN, Y.-R.; CHEN, H.-I.; LIN, Y.-H.; WANG, Y.-Y.; CHEN, Y.-R.; WANG, C.-Y.; KUO, P.-L. 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.

LEIPE, D. D.; WOLF, Y. I.; KOONIN, E. V.; ARAVIND, L. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. **Journal of Molecular Biology**, v. 317, n. 1, p. 41–72, 2002.

LONGTINE, M. S.; DEMARINI, D. J.; VALENCIK, M. L.; AL-AWAR, O. S.; FARES, H.; DE VIRGILIO, C.; PRINGLE, J. R. The septins: roles in cytokinesis and other processes. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 8, n. 1, p. 106–119, 1996.

LUKOYANOVA, N.; BALDWIN, S. A.; TRINICK, J. 3D reconstruction of mammalian septin filaments. **Journal of Molecular Biology**, v. 376, n. 1, p. 1–7, 2008.

MACARA, I. G. Mammalian septins nomenclature. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. 12, p. 4111–4113, 2002.

MACEDO, J. N. A. **Estudos estruturais e funcionais de septinas humanas: a ligação e hidrólise de gtp por sept3, sept5 e sept7**. 2015. 160 f. Tese (Diutorado em Física Biomolecular) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

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, n. 1, p. 95–105, 2013.

MARGUTTI, P.; SORICE, M.; CONTI, F.; DELUNARDO, F.; RACANIELLO, M.; ALESSANDRI, C.; SIRACUSANO, A.; RIGANÒ, R.; PROFUMO, E.; VALESINI, G.; ORTONA, E. Screening of an endothelial cDNA library identifies the C-terminal region of Nedd5 as a novel autoantigen in systemic lupus erythematosus with psychiatric manifestations. **Arthritis Research & Therapy**, v. 7, n. 4, p. R896, 2005.

MARTINEZ, C.; WARE, J. Mammalian septin function in hemostasis and beyond. **Experimental Biology and Medicine**, v. 229, n. 11, p. 1111–1119, 2004.

MARTINEZ, C.; CORRAL, J.; DENT, J. A.; SESMA, L.; VICENTE, V.; WARE, J. Platelet septin complexes form rings and associate with the microtubular network. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 4, n. 6, p. 1388–1395, 2006.

MARTÍNEZ, C.; SANJUAN, M. A.; DENT, J. A.; KARLSSON, L.; WARE, J. Human septin–septin interactions as a prerequisite for targeting septin complexes in the cytosol. **Biochemical Journal**, v. 382, n. 3, p. 783–791, 2004.

MATSUYAMA, B. Y. **Caracterização estrutural e funcional de fleq, fator de transcrição envolvido na expressão de genes flagelares e de formação de biofilme**. 2016. 117 f. Tese (Doutorado em Física Biomolecular) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

MCCOY, A. J.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; ADAMS, P. D.; WINN, M. D.; STORONI, L. C.; READ, R. J. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. 4, p. 658–674, 2007.

MCILHATTON, M. a; BURROWS, J. F.; DONAGHY, P. G.; CHANDULOY, S.; JOHNSTON, P. G.; RUSSELL, S. E. Genomic organization, complex splicing pattern and expression of a human septin gene on chromosome 17q25.3. **Oncogene**, v. 20, n. 41, p. 5930–9, 2001.

MCPHERSON, A. **Introduction to macromolecular crystallography**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2009, p. 256.

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

MORI, T.; MIURA, K.; FUJIWARA, T.; SHIN, S.; INAZAWA, J.; NAKAMURA, Y. Isolation and mapping of a human gene (DIFF6) homologous to yeast CDC3, CDC10, CDC11, and CDC12, and mouse Diff6. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 73, n. 3, p. 224–227, 1996.

NAGATA, K.; ASANO, T.; NOZAWA, Y.; INAGAKI, M. Biochemical and cell biological analyses of a mammalian septin complex, Sept7/9b/11. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 53, p. 55895–55904, 2004.

NAGATA, K. -i.; KAWAJIRI, A.; MATSUI, S.; TAKAGISHI, M.; SHIROMIZU, T.; SAITOH, N.; IZAWA, I.; KIYONO, T.; ITOH, T. J.; HOTANI, H.; INAGAKI, M. Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in human mammary epithelial cells depends on interactions with microtubules. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 20, p. 18538–18543, 2003.

NAKAHIRA, M.; MACEDO, J. N. A.; SERAPHIM, T. V.; CAVALCANTE, N.; SOUZA, T. a C. B.; DAMALIO, J. C. P.; REYES, L. F.; ASSMANN, E. M.; ALBORGHETTI, M. R.; GARRATT, R. C.; ARAUJO, A. P. U.; ZANCHIN, N. I. T.; BARBOSA, J. a R. G.; KOBARG, J. A draft of the human septin interactome. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, p. 13799, 2010.

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

NGUYEN, T. Q.; SAWA, H.; OKANO, H.; WHITE, J. G. The *C. elegans* septin genes, unc-59 and unc-61, are required for normal postembryonic cytokinesis and morphogenesis but have no essential function in embryogenesis. **J Cell Sci**, v. 113, n. 21, p. 3825–3837, 2000.

NISHIHAMA, R.; ONISHI, M.; PRINGLE, J. R. New insights into the phylogenetic distribution and evolutionary origins of the septins. **Biological Chemistry**, v. 392, n. 8-9, 2011.

PASQUALATO, S.; RENAULT, L.; CHERFILS, J. Arf, Arl, Arp and Sar proteins: a family of GTP-binding proteins with a structural device for “front-back” communication. **EMBO reports**, v. 3, n. 11, p. 1035–1041, 2002.

PETERSON, E.; PETTY, E. Conquering the complex world of human septins: implications for health and disease. **Clinical Genetics**, v. 77, n. 6, p. 511–524, 2010.

ROBERTS, A. B.; LARISCH, S.; YI, Y.; LOTAN, R.; KERNER, H.; EIMERL, S.; TONY PARKS, W.; GOTTFRIED, Y.; BIRKEY REFFEY, S.; DE CAESTECKER, M. P.; DANIELPOUR, D.; BOOK-MELAMED, N.; TIMBERG, R.; DUCKETT, C. S.; LECHLEIDER, R. J.; STELLER, H.; ORLY, J.; KIM, S.-J. A novel mitochondrial septin-like protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif. **Nature Cell Biology**, v. 2, n. 12, p. 915–921, 2000.

SANDROCK, K.; BARTSCH, I.; BLÄSER, S.; BUSSE, A.; BUSSE, E.; ZIEGER, B. Characterization of human septin interactions. **Biological Chemistry**, v. 392, n. 8-9, p. 751–761, 2011.

- 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. 5463–5467, 1977.
- 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.
- 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.
- SCOTT, M.; MCCLUGGAGE, W. G.; HILLAN, K. J.; HALL, P. A.; RUSSELL, S. E. H. Altered patterns of transcription of the septin gene, SEPT9, in ovarian tumorigenesis. **International Journal of Cancer**, v. 118, n. 5, p. 1325–1329, 2006.
- SECKLER, R.; WU, G. M.; TIMASHEFF, S. N. Interactions of tubulin with guanylyl - (beta-gamma-methylene) diphosphonate. formation and assembly of a stoichiometric complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 13, p. 7655–7661, 1990.
- SELLIN, M. E.; SANDBLAD, L.; STENMARK, S.; GULLBERG, M. Deciphering the rules governing assembly order of mammalian septin complexes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 22, n. 17, p. 3152–3164, 2011.
- SIRAJUDDIN, M. **Structural studies on mammalian septins – new insights into filament formation**. 2007. 123 f. Tese (Doutorado) Universität Dortmund, 2007.
- 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. 7160, p. 311–315, 2007.
- SIRAJUDDIN, M.; FARKASOVSKY, M.; ZENT, E.; WITTINGHOFER, A. GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 39, p. 16592–16597, 2009.
- SREERAMA, N.; VENYAMINOV, S. Y. U.; WOODY, R. W. Estimation of the number of α -helical and β -strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. **Protein Science**, v. 8, n. 2, p. 370–380, 2008.
- SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252–260, 2000.
- SURKA, M. C. The mammalian septin MSF localizes with microtubules and is required for completion of cytokinesis. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. 10, p. 3532–3545, 2002.
- TELLINGHUISEN, J. Optimizing experimental parameters in isothermal titration calorimetry: Variable volume procedures. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 39, p. 11531–11537, 2007.
- TELLINGHUISEN, J. Isothermal titration calorimetry at very low c. **Analytical Biochemistry**, v. 373, n. 2, p. 395–397, 2008.
- TRIMBLE, W. S.; BEITES, C. L.; XIE, H.; BOWSER, R. The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis. **Nature Neuroscience**, v. 2, n. 5, p. 434–439, 1999.

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

VERSELE, M.; THORNER, J. Septin collar formation in budding yeast requires GTP binding and direct phosphorylation by the PAK, Cla4. **The Journal of Cell Biology**, v. 164, n. 5, p. 701–715, 2004.

VETTER, I. R. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. **Science**, v. 294, n. 5545, p. 1299–1304, 2001.

WATERHOUSE, A. M.; PROCTER, J. B.; MARTIN, D. M. A.; CLAMP, M.; BARTON, G. J. Jalview Version 2 — a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1189–1191, 2009.

WEEMS, A. D.; JOHNSON, C. R.; ARGUESO, J. L.; MCMURRAY, M. A. Higher-order septin assembly is driven by GTP-promoted conformational changes: evidence from unbiased mutational analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 196, n. 3, p. 711–727, 2014.

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

XIE, Y.; VESSEY, J. P.; KONECNA, A.; DAHM, R.; MACCHI, P.; KIEBLER, M. A. The GTP-binding protein septin 7 is critical for dendrite branching and dendritic-spine morphology. **Current Biology**, v. 17, n. 20, p. 1746–1751, 2007.

YANG, J. T.; WU, C.-S. C.; MARTINEZ, H. M. Calculation of protein conformation from circular dichroism. **Methods in Enzymology**, v. 130, p. 208–269, 1986.

YU, N. B.; DING, X. M.; CHEN, F.; SHEN, S. Q.; GU, X.; YU, L. The phosphorylation of SEP2 on Ser118 by casein 2 is important to hepatoma carcinoma cell proliferation. **Biochemistry, Molecular and Cell**, v. 325, n. 1-2, p. 61–67, 2000.

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

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

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.

ZERAIK, A. E.; RINALDI, G.; MANN, V. H.; POPRATILOFF, A.; ARAUJO, A. P. U.; DEMARCO, R.; BRINDLEY, P. J. Septins of platyhelminths: identification, phylogeny, expression and localization among developmental stages of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 12, p. e2602, 2013.

ZHANG, B.; ZHANG, Y.; WANG, Z.; ZHENG, Y. The role of Mg²⁺ cofactor in the guanine nucleotide exchange and GTP hydrolysis reactions of Rho family GTP-binding proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 33, p. 25299–25307, 2000.

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.

Apêndice A - Peptídeos identificados por Espectrometria de Massas referente ao complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9GCα0 (Apêndice 1 a 5).

Apêndice A1: Mapeamento dos peptídeos triptícos da proteína presente na banda 1 no gel do complexo. Os peptídeos gerados foram analisados por espectrometria de massa e os dados foram analisados com o programa Mascot disponível no endereço eletrônico http://www.matrixscience.com/search_form_select.html, identificando a proteína CDC10 que é uma proteína homóloga da SEPT7 humana.

Protein View				
Match to: gi 560623 Score: 1084				
CDC10 homolog [Homo sapiens]				
Taxonomy: Homo sapiens				
Sequence Coverage: 49%				
Matched peptides shown in Bold Red				
1	MVAQQKN LEG	YVG FANLPN Q	VYR SVKR GF	EFT LMV GES
51	LFLTDLYS PE	YGP SHRIK	TVQ VEQSKVL	IKEGGVQ LLL
101	AVDNSNCW QP	VIDYIDSK FE	DYL NAESRVN	RRQMPDN R V Q
151	HGL KPLDIE F	MKRL HEKVNI	IPL IAKADTL	TPEECQQ F KK
201	IKI YEF PETD	DEE ENKLV KK	IKDR LPLAV V	GSNT IEV NG
251	GIAEVENGE H	CDFTILRN MK	IRTHMQDL KD	VTNN VHYEN Y
301	NGVDNNKN KG	QLTK SPLA Q M	EEER REHVAK	MK KMEME MEQ
351	QKL KDSE AEL	QRR HEQM KKN	LEA QHKE LEE	KRR QFEDE KA
401	QQN SSRTLE K	NKKKGK IF		

Apêndice A2: Mapeamento dos peptídeos triptícos da proteína presente na banda 1 no gel do complexo. Os peptídeos gerados foram analisados por espectrometria de massa e os dados foram analisados com o programa Mascot disponível no endereço eletrônico http://www.matrixscience.com/search_form_select.html, identificando a proteína SEPT6 humana.

Protein View				
Match to: gi 22035577 Score: 607				
septin 6 isoform A [Homo sapiens]				
Taxonomy: Homo sapiens				
Sequence Coverage: 33%				
Matched peptides shown in Bold Red				
1	MAATDIAR QV	GEGCR TVPLA	GHV GFDSL PD	QLV NKSV SQG
51	TGL GKSTL MD	TLF NTK FE GE	PATHTQPG VQ	LQSN TYDLQ E
101	STV GFGD QIN	KED SYK PIVE	FIDAQ FEAYL	QEELKIR RV L
151	CLYFIAPT GH	SLK S LDL VTM	KKL DSK VNII	PII AKADAIS
201	ITSELV SNGV	QIYQ FPTDDE	SVAEING TMN	AHL PF AVIGS
251	MRARQYP WGT	VQVENE AHCD	FVK L REMLIR	VN MED LREQT
301	CKLEEMG FKD	TDPDSK PFSL	QET Y EAK RNE	FL GELQ KKEE
351	KEKEAEL KEA	EKELHEK FDR	LKK L HQDE KK	KLED KKKSLD
401	TAA ELLQ SQG	SQ AGGS QTLK	RD KE KN	

Apêndice A3: Mapeamento dos peptídeos triptícos da proteína presente na banda 2 no gel do complexo. Os peptídeos gerados foram analisados por espectrometria de massa e os dados foram analisados com o programa Mascot disponível no endereço eletrônico http://www.matrixscience.com/search_form_select.html, identificando a proteína SEPT7 humana.

Protein View				
Septin-7 OS=Homo sapiens GN=SEPT7 PE=1 SV=2				
Taxonomy : Homo sapiens				
Sequence Coverage : 24%				
Matched peptides shown in bold red .				
1	MSVSARSAAA	EERSVNSSTM	VAQQKNLEGY	VGFANLPNQV YRKSVKRGFE
51	FTLMVVGESG	LGK STLINS L	FLTDLYSPEY	PGPSHRIKKT VQVEQSKVLI
101	KEGGVQLLLT	IVDTPGFGDA	VDNSNCWQPV	IDYIDSK FED YLN AE SRVNR
151	RQMPDNRVQC	CLYFIAPSGH	GLKPLDIEFM	KRLHEK VNII PLIAK ADTLT
201	PEECQQFKKQ	IMKEIQEHKI	KIYEF PETDD	EEENKLVK KI KDRPLAVVG
251	SNTIIEVNGK	RVRGRQYPWG	VAEVENGHC	DFTILRNMLI RTHMQDLK DV
301	TNNVHYEN YR	SRKLA AVTYN	GVDNNK NKGQ	LTKSPLA QME EE REHVAKM
351	KKMEME MEQV	FEMKV KEKVQ	KLKDSEAEQ	RRHEQMKNL EAQHKELEEK
401	RRQFEDEKAN	WEAQQRILEQ	QNSSRTLEKN	KKKGKIF

Apêndice A4: Mapeamento dos peptídeos triptícos da proteína presente na banda 3 no gel do complexo. Os peptídeos gerados foram analisados por espectrometria de massa e os dados foram analisados com o programa Mascot disponível no endereço eletrônico http://www.matrixscience.com/search_form_select.html, identificando a proteína SEPT2 humana.

Protein View				
Match to: gi 4758158 Score: 556				
septin 2 [Homo sapiens]				
Taxonomy: Homo sapiens				
Sequence Coverage: 41%				
Matched peptides shown in Bold Red				
1	MSKQQPTQFI	NPETPGYVGF	ANLPNQVHRK	SVKKGFEFTL MVVGESGLGK
51	STLINS L FLT	DLYPER VIPG	AAEKI ERTVQ	IEAST VEIEE RGVKLR LTVV
101	DTPGY GDAIN	CRDCF KTIIS	YIDEQ FERYL	HDE SGLNRH IIDNRVHCCF
151	YFISPFHGHL	KPLDVAFMKA	IHNKVNIVPV	IAKAD TLTLK ERERLKKRIL
201	DEIEE HNKI	YHLPDAESDE	DEDFKEQTRL	LKASIPFSV GSNQL IEAKG
251	KKVRGR LYPW	GVVE VENPEH	NDFLK LRTML	ITHMQDLQEV TQDLHYENFR
301	SERLKRGGRK	VENEDMNKDQ	ILLEKEAELR	RMQ EMIARMQ AQMQMQMQGG
351	DGDGGALGHH	V		

Apêndice A5: Mapeamento dos peptídeos triptícos da proteína presente na banda 4 no gel do complexo. Os peptídeos gerados foram analisados por espectrometria de massa e os dados foram analisados com o programa Mascot disponível no endereço eletrônico http://www.matrixscience.com/search_form_select.html, identificando a proteína SEPT9 humana.

Protein View

Match to: **gi|5262571** Score: 58

hypothetical protein [Homo sapiens]

Taxonomy: [Homo sapiens](#)

Sequence Coverage: 9%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

      1 GVRMKLTVID TPGFGDHINN ENCWQPIMKF INDQYEKYLQ EEVNINRKKR
     51 IPDTRVHCCL YFIPATGHSL RPLDIEFMKR LSKVVNIVPV IAKADTLTLE
    101 ERVHFKQRIT ADLLSNGIDV YPQKEFDEDS EDRLVNEKFR EMIPFAVVGS
    151 DHEYQVNGKR ILGRKTKWGT IEVENTTHCE FAYLRDLLIR THMQNIKDIT
    201 SSIHFEAYRV KRLNEGSSAM ANGVEEKEPE APEM
  
```