**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS**

Gabriel Brognara

**Caracterização estrutural e biofísica da septina 7 humana
e de seus complexos com as septinas 3 e 9**

São Carlos

2019

Gabriel Brognara

**Caracterização estrutural e biofísica da septina 7 humana
e de seus complexos com as septinas 3 e 9**

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

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Paula Ulian de Araújo

Coorientador: Prof. Dr. Richard Charles Garratt

Versão corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2019

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

Brognara, Gabriel

Caracterização estrutural e biofísica da septina 7 humana e de seus complexos com as septinas 3 e 9 / Gabriel Brognara; orientador Ana Paula Ulian de Araujo; co-orientador Richard Charles Garratt - versão corrigida - - São Carlos, 2019.
107 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2019.

1. Septinas. 2. Dominio GTPase. 3. Termoestabilidade. 4. Oligomerização. I. Araujo, Ana Paula Ulian de, orient. II. Garratt, Richard Charles, co-orient. III. Título.

À minha avó de consideração Derminda Isabel de Moraes.

AGRADECIMENTOS

À D. Isabel de Moraes pelo apoio incondicional desde o primeiro dia que eu cheguei ao laboratório. Mesmo quando as ‘serpentinhas’ dificultavam o meu trabalho, ela sempre conseguiu me motivar a não desistir. Tenho orgulho de ser considerado o seu netinho, um título que sem dúvida significa muito para mim.

Aos meus orientadores, Prof.^a Dr.^a Ana Paula U. de Araújo e Prof. Dr. Richard C. Garratt. Em especial, à Ana Paula por me acolher no seu laboratório e incentivar o meu desenvolvimento intelectual. Já ao Richard, agradeço pela paciência, resiliência durante a escrita do nosso artigo e, principalmente, por ter me ensinado a analisar criticamente estruturas cristalográficas de septinas.

Ao Prof. Dr. Ricardo De Marco pelos conselhos e por estar sempre disposto a me ajudar com suas análises de bioinformática.

À Dr.^a Andressa P. Alves Pinto por ter sido minha mentora ao longo de todos esses anos. Muitos dos experimentos e discussões realizadas nesse trabalho foram frutos de suas ideias e, por isso, sou eternamente grato.

Ao meu amigo, Dr. Humberto D’Muniz Pereira, por me ensinar a refinar estruturas cristalográficas, pela disposição em escrever o manuscrito do meu artigo junto comigo e pela oportunidade de coletar dados de difração no *Diamond Light Source*.

Ao Dr. José Fernando de Lima e Dr. Rafael Spadaccia Panhota pela sincera amizade e descontraídas conversas. Afinal, quando os experimentos não dão certo, só nos resta tomar um café e darmos umas risadas para podermos seguir em frente no dia seguinte.

À Dr.^a Patrícia S. Kumagai e ao Prof. Dr. José Luiz de S. Lopes pela oportunidade de aprender sobre dicroísmo circular com radiação síncrotron. À Patrícia, em especial, agradeço também pela ajuda nos experimentos de SAXS e ThT.

Ao Dr. Samuel L. Guimarães por me ensinar a desenvolver um protocolo de purificação de proteínas recombinantes extremamente eficiente, pela disposição em me ajudar nos ensaios de cristalização e pelo auxílio durante a determinação de estruturas cristalográficas.

Ao Me. Diego A. Leonardo Cabrejos e Higor Vinícius D. Rosa pelo companheirismo, ajuda nos experimentos de DSF, e pelas empolgadas discussões sobre as estruturas cristalográficas das septinas azuis e vermelhas.

À minha parceira, Me.^a Déborah C. Mendonça, pela coleta e análise das micrografias eletrônicas de transmissão.

À Dr.^a Jéssica F. Scortecchi e ao Me. Adriano de F. Fernandes especialmente por me ensinarem a coletar e analisar dados de difração. Ao Adriano também sou grato pela auxílio na determinação dos envelopes moleculares por SAXS.

À Dr.^a Sinara T. do Brasil Moraes e ao Dr. Éverton Edésio D. Silva pela amizade e por, respectivamente, ajudar-me na purificação da septina 7 de *Ciona intestinalis* e na análise de dados do SEC-MALS.

Aos meus amigos e colegas do laboratório: Dr.^a Ana Eliza Zeraik, Diogo Maciel D. da Mota, Me.^a Fernanda A. Sala, Dr. Ítalo A. Cavini, Me.^a Jakeline De F. Ferreira, Me.^a Júlia Mara Martins, Leonardo Delphito, Me. Leonardo R. de Almeida, Dr. Luís G. Mansor Basso, Luíza Zuvanov de Faria, Marina G. Fontes, Me. Marcela N. Argentin, Rafael Marques da Silva, Rejane Nogueira Brasil e Dr.^a Susana A. S. Beozzo.

Aos meus pais, Maria Cecília R. Brognara e Edgard Brognara Jr., e irmãos, Gustavo e Fernanda Brognara, por estarem sempre ao meu lado. Sinceramente, eu não teria conseguido realizar esse trabalho sem o amparo deles.

Aos meus queridos amigos, Eduardo F. Bueno, Flávio P. De Almeida Filho, Giovanni A. Tango e Lucas F. Sciuti, por me apoiarem em períodos difíceis e me ajudarem a crescer pessoal e profissionalmente.

Ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo pela infraestrutura necessária ao desenvolvimento desse trabalho.

Às agências de fomento FAPESP (2014/15546-1) e CAPES (PROEX) pelo suporte financeiro.

*“When you’ve seen beyond yourself
then you may find, peace of mind, is waiting there.
And the time will come when you see we’re all one,
and life flows on within you and without you.”*

George Harrison

RESUMO

BROGNARA, G. **Caracterização estrutural e biofísica da septina 7 humana e de seus complexos com as septinas 3 e 9.** 2019. 107p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

As septinas são proteínas filogeneticamente classificadas na superclasse das *P-loop* GTPases e que, juntamente com actina, microtúbulos e filamentos intermediários, são consideradas o quarto componente do citoesqueleto. Para exercer essa função, as septinas tendem a interagir entre si formando heterocomplexos que, posteriormente, polimerizam-se em filamentos. A fim de compreender a arquitetura e dinâmica das septinas, realizou-se a caracterização estrutural e biofísica da septina 7 humana e de seus complexos com as septinas 3 e 9. Devido ao fato da septina 7 ser única em seu grupo, tem-se que a mesma é insubstituível e, portanto, está presente em todos os heterocomplexos descritos. Visando compreender os elementos moleculares responsáveis por tal unicidade, são apresentadas duas estruturas em alta resolução do domínio GTPase da septina 7 ligada a GDP. Pela primeira vez, verificou-se que o cofator Mg^{2+} está coordenado de uma maneira mais fraca (em relações aos padrões já descritos na literatura) e que o contato entre o *switches II* na interface-G (ponte- β antiparalela) aparenta estar relacionado ao fenômeno de deslizamento da fita- β_3 . Na verdade, os resultados indicam que tal fenômeno seria um artifício utilizado pelas septinas a fim de desestimular interfaces promíscuas. Além disso, estudos de termoestabilidade mostraram que as septinas 3 e 9 acabam por diminuir a estabilidade de seus heterodímeros com a septina 7; um resultado que pode estar relacionado com a dinâmica de formação de filamentos. Devido a uma suposta interação mais fraca, tem-se que tais septinas poderiam talvez apresentar uma maior flexibilidade na constituição dos filamentos. Por outro lado, ao realizar a mutação T282Y na septina 3, nota-se que a mesma é responsável por aumentar significativamente a termoestabilidade do heterodímero. A partir da estrutura cristalográfica deste complexo, observou-se que tal tirosina é responsável pelo estabelecimento de interações de hidrogênio com o anel guanina e com a septina 7; promovendo a estabilização da interface-G. Por último, com o intuito de identificar qual interface-NC do heterodímero constituído pelas septinas 7 e 9 é a responsável pela sua oligomerização a um tetrâmero, avaliou-se a dependência de tais septinas com a força iônica.

Palavras-chave: Septinas. Domínio GTPase. Termoestabilidade. Oligomerização.

ABSTRACT

BROGNARA, G. **Structural and biophysical characterization of human septin 7 and its complexes with septins 3 and 9.** 2019. 107p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

The septins phylogenetically belong to the P-loop GTPase superclass of proteins and, together with actin, microtubules and intermediate filaments, are considered the fourth component of the cytoskeleton. To perform this role, the septins tend to interact with each other to form heterocomplexes, which can further polymerize into filaments. In order to understand the architecture and dynamics of septins, a structural and biophysical characterization of human septin 7 and its complexes with septins 3 and 9 were performed. Since septin 7 is single in its own group, it is irreplaceable and therefore present in all heterocomplexes. Toward understanding the molecular elements responsible for such unicity, two high-resolution structures of septin 7 GTPase domain complexed with GDP are presented. For the first time, it has been found that the Mg^{2+} cofactor is weakly coordinated (in relation to the patterns already described in the literature) and that the contact between the switches II at the G-interface (antiparallel β -bridge) appears to be related to the phenomenon of β_3 -stand slippage. In fact, the results indicate this phenomenon could be thought of as a way to discourage promiscuous interfaces. In addition, thermostability assays have shown that septin 3 and 9 end up decreasing the stability of their heterodimers with septin 7; a result that may be related to the filament dynamics. Due to this supposed weaker interaction, it has been speculated that this septins could perhaps have a greater flexibility in the composition of the filaments. On the other hand, the T282Y mutation inserted into septin 3 significantly increases the heterodimer thermostability. In the crystal structure of this complex, it was observed that this particular tyrosine establishes a hydrogen bond with the guanine ring and with septin 7; promoting the stabilization of the G-interface. Finally, in order to identify which NC-interface of the heterodimer constituted by septin 7 and 9 is responsible for its oligomerization to a tetramer, the dependence of this septins with the ionic strength was analyzed.

Keywords: Septins. GTPase domain. Thermostability. Oligomerization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Filamentos anelares de septinas (indicados pelas setas) durante a divisão celular da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Barra equivalente a 0.1 μm	27
Figura 2 – As septinas podem atuar como suporte molecular e/ou barreiras de difusão em diversos processos biológicos, como: (a) na divisão celular; (b) na formação de protuberâncias na membrana plasmática, no recrutamento de receptores e transportadores; e na base (c) do annulus do espermatozoide ou (d) de cílio.	28
Figura 3 – Árvore filogenética das septinas humanas evidenciando os quatro grupos representados pelas SEPT2 (vermelho), SEPT6 (azul), SEPT7 (amarelo) e SEPT3 (verde).	29
Figura 4 – Estrutura cristalográfica do domínio G da H-Ras p21 complexada a GDP e Mg^{2+} ressaltando os cinco motivos estruturas G (PDB ID 5P21).	30
Figura 5 – Topologia do domínio G das (a) Ras e (b) septinas, indicando as hélices- α e fitas- β conservadas entre si em azul e verde respectivamente; além das inserções características em vermelho. (c) Representação estrutural do domínio G das septinas quando ligado a GTP e ao cofator Mg^{2+} .	31
Figura 6 – Diagrama do mecanismo de hidrólise do tipo <i>loaded spring</i> evidenciando (a) a rigidez dos <i>switches</i> no estado com GTP e (b) a sua flexibilidade no com GDP.	33
Figura 7 – Esquema do ciclo funcional das proteínas G, destacando as proteínas (a) semelhantes às Ras e as (b) ativadas por dimerização (GADs). Note que ao contrário das Ras, as GADs não precisam de GEFs e GAPs para realizar a troca e a hidrólise do nucleotídeo respectivamente. Porém, assume-se que ambas possuem o estado <i>ON</i> quando ligadas a GTP e <i>OFF</i> , a GDP.	34
Figura 8 – Representação estrutural e esquemática das interfaces (a) -G e (b) -NC utilizadas durante a dimerização de septinas.	35
Figura 9 – Interações estabelecidas pelo <i>P-loop</i> (amarelo) no caso de SEPT3 ligada a (a) GppNHp (PDB ID 4Z51) e (b) GDP (PDB ID 4Z54). Note que, após a hidrólise do fosfato- γ , uma nova molécula de água é responsável por completar a esfera de coordenação do Mg^{2+} . Cada subunidade está colorida com uma tonalidade de verde diferente.	36
Figura 10 – Interações estabelecidas na região do anel guanina no caso da (a) SEPT3 (PDB ID 4Z54) e (b) SEPT2 (PDB ID 2QNR). Para identificar cada uma das subunidades, estas foram coloridas em duas diferentes tonalidades (claro e escuro) numa mesma cor.	37

Figura 11 – Diagramas das interações de hidrogênio estabelecidas entre as fitas- β_1 , β_2 e β_3 destacando o deslizamento das fitas (seta preta) no caso de (a) <i>SmSEPT10</i> e (b) <i>SEPT2</i> . Representações esquemáticas do mecanismo do deslizamento da fita- β_3 em direção a interface-G observado na (c) <i>SmSEPT10</i> e (d) <i>SEPT2</i> evidenciando a importância dos nucleotídeos e do íon Mg^{2+}	38
Figura 12 – Padrões de interações verificados na interface-NC de (a) <i>SEPT2</i> (vermelho, PDB ID 2QNR) e (b) <i>SEPT3</i> (verde, PDB ID 4Z54). Cada subunidade está colorida com a mesma cor, mas em tonalidades diferentes para serem distinguidas.	40
Figura 13 – Estrutura cristalográfica do heterocomplexo formado pela <i>SEPT2</i> (vermelho), <i>SEPT6</i> (azul) e <i>SEPT7</i> (amarelo) evidenciando os seus respectivos nucleotídeos (PDB ID 2QAG).	40
Figura 14 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão obtidas através de constatação negativa (a) do hexâmero <i>SEPT2-6-7</i> e (b) de <i>SEPT2MBP-6-7</i> , mostrando o posicionamento central da <i>SEPT2</i>	41
Figura 15 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão obtidas através de contraste negativa do hexâmero <i>SEPT2-6-7</i> , onde a <i>SEPT2</i> está fusionada a MBP. Note, que devido a existência de um <i>linker</i> , a MBP é capaz de adotar diversas posições ao redor da <i>SEPT2</i> localizada na extremidade. Ressalta-se que, durante o processamento dos dados, a MBP foi sempre posicionada na extremidade superior do hexâmero.	42
Figura 16 – Diagrama de substituição das septinas nos heterocomplexos de acordo com as ‘Regras de Kinoshita’ que sugerem a existência de 60 diferentes combinações.	43
Figura 17 – Representação esquemática dos filamentos, <i>bundles</i> e anéis formados a partir do heterocomplexo base.	44
Figura 18 – (a) Cromatografia de afinidade ao níquel da <i>SEPT7G</i> e análise por SDS-PAGE 12% (m/v); M: padrão de massa molecular (kDa), 1: fração solúvel após a lise celular, 2: proteínas não-ligadas à resina, 3: lavagem com 10% de tampão B e 4: eluição. (b) Cromatografia de exclusão molecular da <i>SEPT7G</i> e SDS-PAGE 12% (m/v); M: padrão de massa molecular (kDa) e 1: fração do pico mais intenso (15.3 ml).	60
Figura 19 – Cromatografia de troca iônica (a) dos nucleotídeos GDP e GTP (padrões) e (b) do conteúdo liberado pelo homodímero <i>SEPT7G-7G</i>	61
Figura 20 – Perfil cromatográfico obtido no SEC-MALS do homodímero <i>SEPT7G-7G</i> ; evidenciando o espalhamento de luz a 90° normalizado (linha vermelha), o índice de refração diferencial normalizado (linha azul) e a massa molecular do pico correspondente (linha preta).	61

Figura 21 – (a) Curva de SAXS seguida do respectivo (b) Kratky <i>plot</i> do homodímero SEPT7G-7G.	62
Figura 22 – (a) Distribuição de pares de distâncias $P(r)$ e (b) envelope molecular do homodímero SEPT7G-7G alinhado com a estrutura da SEPT7G (PDB ID 6N12).	62
Figura 23 – Cristais da SEPT7G obtidos na condição (a) G7 e (b) A10 do kit <i>Morpheus</i> seguidos dos respectivos <i>grid scans</i> dos cristais utilizados durante a coleta.	63
Figura 24 – (a) Superposição estrutural da SEPT7G de PDB ID 6N12 (em amarelo) com as de PDB IDs 3TW4 (em azul) e 3T5D (em vermelho); tanto o GDP quanto o íon Mg^{2+} foram coloridos em tonalidades mais claras. (b) Superposição dos dímeros de PDB ID 6N12 (em amarelo) com o de PDB ID 6N0B (em laranja) evidenciando a ausência do deslizamento da fita- β_3 (em verde na 6N12 e azul na 6N0B); o GDP e o Mg^{2+} na 6N12 foram coloridos de verde e o GDP na 6N0B de azul.	66
Figura 25 – (a) Coordenação do íon Mg^{2+} na SEPT7G $P6_1$ (PDB ID 6N12) e (b) a sua ausência na estrutura $C2$ (PDB ID 6N0B); mapa <i>omit</i> em 1.0σ	67
Figura 26 – (a) Pareamento estrutural (ponte- β) da região do <i>switch II</i> observado na SEPT7G (PDB ID 6N0B); uma subunidade está em amarelo e outra em laranja. (b) Alinhamento sequencial da região do <i>switch II</i> de todas as septinas humanas, enfatizando a conservação dos resíduos <i>Asp/Asn</i> a partir de uma seta (letras em negrito) e o motivo estrutural G3 (caixa azul); a numeração utilizada faz referência a septina 7. (c) Região de pareamento na SEPT7G (PDB ID 6N0B) e (d) a ausência da ponte- β na estrutura de <i>SmSEPT10</i> (PDB ID 4KVA). Em (c) e (d), a conexão entre β_3 e α_2 (incluindo o <i>switch II</i>) está colorida.	68
Figura 27 – (a) Cromatografia de afinidade ao níquel da SEPT7G-3GC e análise por SDS-PAGE 12% (m/v); M: padrão de massa molecular (kDa), 1: fração solúvel após a lise celular, 2: proteínas não-ligadas à resina, 3: lavagem com 10% de tampão B e 4: eluição. (b) Cromatografia de exclusão molecular da SEPT7G-3GC e SDS-PAGE 12% (m/v); M: padrão de massa molecular (kDa), 1: fração do pico mais intenso (14.8 ml) e 2: fração referente ao volume de eluição ~ 16.0 ml.	71

Figura 28 – (a) Cromatografia de afinidade ao níquel da SEPT7G-3GC _{T282Y} e análise por SDS-PAGE 12% (m/v); M: padrão de massa molecular (kDa), 1: fração solúvel após a lise celular, 2: proteínas não-ligadas à resina, 3: lavagem com 10% de tampão B e 4: eluição. (b) Cromatografia de exclusão molecular da SEPT7G-3GC _{T282Y} e SDS-PAGE 12% (m/v); M: padrão de massa molecular (kDa) e 1: fração do pico mais intenso (14.6 ml).	72
Figura 29 – (a) Cromatografia de afinidade ao níquel da SEPT7G-9GC e análise por SDS-PAGE 12% (m/v); M: padrão de massa molecular (kDa), 1: fração solúvel após a lise celular, 2: proteínas não-ligadas à resina, 3: lavagem com 10% de tampão B e 4: eluição. (b) Cromatografia de exclusão molecular da SEPT7G-9GC e SDS-PAGE 12% (m/v); M: padrão de massa molecular (kDa), 1: fração do pico mais intenso (14.6 ml) e 2: fração referente ao volume de eluição ~16.0 ml.	73
Figura 30 – Cromatografia de troca iônica do conteúdo liberado pelos heterodímeros (a) SEPT7G-3GCG, (b) SEPT7G-3GC _{T282Y} e (c) SEPT7G-9GC, evidenciando a presença de GDP.	74
Figura 31 – Perfil cromatográfico dos heterodímeros obtido no SEC-MALS (a) SEPT7G-3GC, (b) SEPT7G-3GC _{T282Y} e (c) SEPT7G-9GC; evidenciando o espalhamento de luz a 90° normalizado (linha vermelha), o índice de refração diferencial normalizado (linha azul) e a massa molecular do pico correspondente (linha preta).	75
Figura 32 – Curvas de SAXS dos heterodímeros (a) SEPT7G-3GC, (c) SEPT7G-3GC _{T282Y} e (d) SEPT7G-9GC seguidas de seus respectivos Kratky <i>plots</i> (b), (d) e (f).	76
Figura 33 – (a) Distribuição de pares de distâncias P(r) dos heterodímeros (a) SEPT7G-3GC, (c) SEPT7G-3GC _{T282Y} e (d) SEPT7G-9GC e seus respectivos envelopes moleculares (b), (d) e (f). Os envelopes da SEPT7G-3GC e SEPT7G-9GC foram alinhados com a estrutura da SEPT7G (PDB ID 6N12), enquanto que o da SEPT7G-3GC _{T282Y} com a sua própria estrutura.	77
Figura 34 – DSF dos dímeros: SEPT7G-7G (linha azul), SEPT7G-3GC (linha amarela), SEPT7G-3GC _{T282Y} (linha verde) e SEPT7G-9GC (linha vermelha).	78
Figura 35 – Curvas de SAXS do homodímero SEPT7G-7G nas temperaturas de 20, 37 e 50 °C seguidas de seus respectivos Kratky <i>plots</i> (b), (d) e (f). Em cada temperatura, a dependência temporal é indicada pelos pontos vermelhos (3 min), verdes (6 min) e azuis (9 min).	80

Figura 36 – Curvas de SAXS do heterodímero SEPT7G-3GC nas temperaturas de 20, 37 e 50 °C seguidas de seus respectivos Kratky <i>plots</i> (b), (d) e (f). Em cada temperatura, a dependência temporal é indicada pelos pontos vermelhos (3 min), verdes (6 min) e azuis (9 min).	81
Figura 37 – Curvas de SAXS do heterodímero SEPT7G-9GC nas temperaturas de 20, 37 e 50 °C seguidas de seus respectivos Kratky <i>plots</i> (b), (d) e (f). Em cada temperatura, a dependência temporal é indicada pelos pontos vermelhos (3 min), verdes (6 min) e azuis (9 min).	81
Figura 38 – Curvas de SAXS do heterodímero SEPT7G-3GC _{T282Y} nas temperaturas de 20, 37 e 50 °C seguidas de seus respectivos Kratky <i>plots</i> (b), (d) e (f). Em cada temperatura, a dependência temporal é indicada pelos pontos vermelhos (3 min), verdes (6 min) e azuis (9 min).	82
Figura 39 – Cinética de fluorescência do ThT dos dímeros SEPT7G-7G (azul), SEPT7G-9GC (vermelho), SEPT7G-3GC (amarelo) e SEPT7G-3GC _{T282Y} (verde) quando monitorada a (a) 20, (b) 37, (c) 42 e (d) 50 °C.	83
Figura 40 – Cristais da SEPT7G-3GC _{T282Y} obtidos na condição G3 do kit <i>Morpheus</i> seguido do <i>grid scan</i> do cristal utilizado durante a coleta.	84
Figura 41 – Estrutura do heterodímero SEPT7G-3GC _{T282Y} evidenciando o não deslizamento da fita- β_3 (colorida em vermelho na SEPT7G e azul na SEPT3GC _{T282Y}). (b) Pareamento estrutural (ponte- β) do <i>switch II</i> observado no heterodímero. Tal região está destacada por um círculo em (a). Em ambas, a SEPT7G está sempre em amarelo e a SEPT3GC _{T282Y} em verde.	86
Figura 42 – Conformação adotada pelo <i>switch I</i> no caso (a) da SEPT3GC com Mg ²⁺ (PDB ID 4Z54) e (b) da SEPT3GC _{T282Y} sem Mg ²⁺ . Os resíduos do <i>P-loop</i> estão identificados em amarelo.	87
Figura 43 – Interações estabelecidas na região do anel guanina no caso (a) SEPT7G (PDB ID 6N0B), (b) SEPT7G-3GC _{T282Y} e (c) SEPT3GC (PDB ID 4Z54). No caso dos homodímeros, cada subunidade está colorida em duas diferentes tonalidades (claro e escuro), enquanto que, no heterodímero, a SEPT7G está em amarelo e a SEPT3GC _{T282Y} em verde.	88
Figura 44 – (a) Rede cristalina do heterodímero SEPT7G-3GC _{T282Y} , evidenciando a interface-NC aberta da SEPT7G (amarelo) e fechada da SEPT3GC _{T282Y} (verde). Padrões de interações verificados na interface-NC da (b) SEPT7G (PDB ID 6N0B) e (c) da SEPT3GC _{T282Y} ; cada subunidade está colorida com a mesma cor, mas em tonalidades diferentes para serem distinguidas.	89

Figura 45 – Purificação por cromatografia de afinidade da SEPT9GC (a) quando fusionada a SUMO e (b) após a clivagem com SUMO protease. (c) Análise da expressão e purificação por SDS-PAGE 12% (m/v); M: padrão de massa molecular (kDa), 1: fração solúvel após a lise celular, 2: proteínas não-ligadas à resina, 3: lavagem com 12% de tampão B, 4: eluição da 1ª afinidade, 5: amostra antes da clivagem, 6: depois da clivagem, 7: ‘lavagem’ com 6% de tampão B e 8: eluição da 2ª afinidade.	91
Figura 46 – (a) Cromatografia de exclusão molecular da SEPT9GC e análise da eluição por SDS-PAGE 12% (m/v); M: padrão de massa molecular (kDa) e 1: fração do pico mais intenso (15.7 ml). (b) Perfil cromatográfico obtido no SEC-MALS do monômero SEPT9GC; evidenciando o espalhamento de luz a 90° normalizado (linha vermelha), o índice de refração diferencial normalizado (linha azul) e a massa molecular do pico correspondente (linha preta).	92
Figura 47 – Cromatografia de troca iônica do conteúdo liberado pelo monômero SEPT9GC, evidenciando a ausência de nucleotídeos.	93
Figura 48 – (a) Cromatografia de exclusão molecular da SEPT7G-9GC no tampão com 40 mM (roxo) e 300 mM NaCl (vermelho) juntamente do gel de SDS-PAGE 12% (m/v) referente à primeira situação; M: padrão de massa molecular (kDa), 1: fração do pico mais intenso (12.8 ml), 2: do pico de intensidade intermediária (14.6 ml) e 3: do menor pico (~16.0 ml). (b) Perfil cromatográfico obtido no SEC-MALS do tetrâmero SEPT7G-9GC; evidenciando o espalhamento de luz a 90° normalizado (linha vermelha), o índice de refração diferencial normalizado (linha azul) e a massa molecular do pico correspondente (linha preta).	94
Figura 49 – (a) Curva de SAXS seguida do respectivo (b) Kratky <i>plot</i> do tetrâmero SEPT7G-9GC.	94
Figura 50 – (a) Distribuição de pares de distâncias $P(r)$ e (b) envelope molecular do tetrâmero SEPT7G-9GC alinhado com a estrutura da SEPT7G (PDB ID 6N12).	95
Figura 51 – Cromatografia de troca iônica (a) dos nucleotídeos GDP e GTP (padrões) e (b) do conteúdo liberado pelo tetrâmero SEPT7G-9GC.	96
Figura 52 – Representação esquemática das possíveis organizações do tetrâmero SEPT7G-9GC.	96
Figura 53 – Cromatografia de exclusão molecular da (a) SEPT7G no tampão com 300 mM (azul escuro) e 40 mM NaCl (azul claro) e da (b) SEPT9GC no tampão com 300 mM (vermelho) e 40 mM NaCl (amarelo).	97

Figura 54 – Cromatografia de exclusão molecular da SEPT9GC no tampão com (a) 300 mM (vermelho) e 40 mM NaCl (amarelo). Além disso, em cada caso, incubou-se com 5X de GDP (azul), GTP (verde) e GTP γ S (vermelho).	98
Figura 55 – (a) Micrografia eletrônica do filamento de SEPT7G-9GC. (b) Detalhes da região identificada por um quadrado em (a), destacando a espessura do filamento. Barras de escalas equivalentes a 500 e 100 nm respectivamente.	99
Figura 56 – Micrografia eletrônica da SEPT7G-9GC no tampão com (a) 300 mM, (b) 150 mM e (c) 40 mM de NaCl. Barras de escalas equivalentes a 200 nm.	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Construções para expressão das septinas utilizadas, seguidas de seus vetores, sítios de restrição, numeração equivalente das sequências de DNA codificantes (CDS) e respectivos resíduos de aminoácidos.	48
Tabela 2 – Valores calculados das massas moleculares (MM) e dos coeficientes de extinção molar (ϵ_0) das septinas analisadas considerando diferentes estados oligoméricos.	51
Tabela 3 – Dados de coleta e estatísticas de refinamento das duas estruturas da SEPT7G. Em parênteses estão os valores referentes a camada de mais alta resolução.	64
Tabela 4 – Teor de nucleotídeo verificados nos dímeros SEPT7G-7G, SEPT7G-3GC, SEPT7G-3GC _{T282Y} e SEPT7G-9GC seguidos das áreas dos respectivos picos de eluição medidos a 253 nm.	74
Tabela 5 – Temperaturas de transição (T_m) dos dímeros SEPT7G-7G, SEPT7G-3GC, SEPT7G-3GC _{T282Y} e SEPT7G-9GC seguidos das respectivas variações em relação ao dímero SEPT7G-7G (ΔT_m^{7G}).	79
Tabela 6 – Dados de coleta e estatísticas de refinamento da estrutura da SEPT7G-3GC _{T282Y} . Em parênteses estão os valores referentes a camada de mais alta resolução.	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Arfs	<i>ADP Ribosylation factors</i>
ATP	Adenosina trifosfato
Borgs	<i>Binders Of Rho GTPases</i>
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
cdc	<i>Cell Division Cycle</i>
Cdc 42	<i>Cell Division Control protein 42</i>
CDS	Sequência de DNA codificante
D_{max}	Distância máxima
Domínio G	Domínio de ligação ao nucleotídeo guanosina
dRI	<i>Differential Refractive Index</i>
DSF	<i>Differential Scanning Fluorimetry</i>
GADs	<i>G proteins Activated by Dimerization</i>
GAPs	<i>GTPase Activating Proteins</i>
GDP	Guanosina difosfato
GEFs	<i>Guanine nucleotide Exchange Factors</i>
GPCRs	<i>G Protein-Coupled Receptors</i>
GppNHp	Guanosina-5'-[(β,γ)-imido]trifosfato
GTP	Guanosina trifosfato
GTP γ S	Guanosina-5'-[γ -tio]trifosfato
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
I(q)	Intensidade dos raios-X em função de q
k_D	Constante de dissociação
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LS	<i>Light Scattering</i>

MBP	<i>Maltose Binding Protein</i>
MM	Massa molecular
MSC	Sítio múltiplo de clonagem
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
P(r)	Distribuição de pares de distâncias
q	Vetor de espalhamento
r	Distância
Rho	<i>Ras Homologous protein</i>
RMSD	<i>Root-Mean-Square Deviation</i>
SAXS	<i>Small-Angle X-ray Scattering</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SEC-MALS	<i>Size Exclusion Chromatography coupled with Multi-Angle Light Scattering</i>
SEPT	Septina humana
<i>Sm</i> SEPT	Septina de <i>Shistosoma mansoni</i>
SUMO	<i>Small Ubiquitin-related Modifier</i>
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
ThT	<i>Thioflavin T fluorescence spectroscopy</i>
T _m	Temperatura de transição
TRAFAC	<i>Translation factor</i>
ΔT _m	Variação da temperatura de transição
% B	Porcentagem do tampão B

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	Septinas	27
1.2	Septinas humanas	28
1.3	Domínio G	29
1.4	Heterocomplexos e filamentos	40
2	JUSTIFICATIVA	45
3	METODOLOGIA	47
3.1	Produção heteróloga	47
3.1.1	Clonagem e expressão heteróloga	47
3.1.2	Purificação de proteínas recombinantes	49
3.2	Caracterização bioquímica	52
3.2.1	Determinação do teor de nucleotídeo por cromatografia de troca iônica	52
3.2.2	Espalhamento multiangular de luz acoplado a cromatografia de exclusão molecular (SEC-MALS)	52
3.3	Caracterização biofísica	53
3.3.1	Fluorimetria diferencial de varredura (DSF)	53
3.3.2	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)	53
3.3.3	Espectroscopia de fluorescência com Tioflavina T (ThT)	54
3.4	Caracterização estrutural	54
3.4.1	Cristalografia de raios-X	54
3.4.2	Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	56
4	DOMÍNIO G DE SEPT7	59
4.1	Objetivos	59
4.2	Resultados e discussão	59
4.2.1	Cromatografias de afinidade ao níquel e exclusão molecular	59
4.2.2	Análise do teor de nucleotídeo	60
4.2.3	Descrição do estado oligomérico	60
4.2.4	Cristalização	63
4.2.5	Caracterização estrutural	65
4.3	Conclusão	70
5	ESTABILIDADE TÉRMICA DE DÍMEROS	71
5.1	Objetivos	71
5.2	Resultados e discussão	71

5.2.1	Purificação dos complexos diméricos	71
5.2.2	Análise do teor de nucleotídeo	74
5.2.3	Descrição do estado oligomérico	74
5.2.4	Termoestabilidade dos dímeros	78
5.2.5	Formação de agregados proteicos do tipo β -amilóide	82
5.2.6	Cristalização da SEPT7G-3GC _{T282Y}	84
5.2.7	Caracterização estrutural da SEPT7G-3GC _{T282Y}	84
5.3	Conclusão	89
6	DEPENDÊNCIA DO ESTADO OLIGOMÉRICO EM FUNÇÃO DA FORÇA IÔNICA	91
6.1	Objetivos	91
6.2	Resultados e discussão	91
6.2.1	Caracterização da SEPT9GC	91
6.2.2	Descrição do estado oligomérico considerando diferentes forças iônicas	93
6.2.3	Filamentos constituídos de SEPT7G-9GC	98
6.3	Conclusão	100
	REFERÊNCIAS	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 Septinas

As septinas foram descobertas no início da década de 70 por meio de uma triagem genética de mutantes em *Saccharomyces cerevisiae*, com o intuito de identificar genes cruciais à divisão celular.¹ Observou-se que mutações em quatro genes resultavam em alterações no fenótipo celular e tais genes foram descritos como essenciais, sendo denominados *cdc3*, *cdc10*, *cdc11* e *cdc12* (do inglês *Cell Division Cycle: cdc*). Estudos posteriores permitiram a visualização de anéis localizados no septo de brotamento (Figura 1) de tal levedura², sendo a presença dos produtos de tais genes nesses filamentos confirmada anos depois.³⁻⁵ Consequentemente, essa nova família de proteínas passou a ser denominada ‘septinas’ fazendo alusão à sua participação na formação do septo durante o processo de citocinese.

Figura 1 – Filamentos anelares de septinas (indicados pelas setas) durante a divisão celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Barra equivalente a 0.1 μm

Fonte: Adaptada de BYERS.²

A presença de septinas é verificada também em outros organismos, principalmente eucariotos, tais como: platelmintos (*Schistosoma mansoni*),⁶ algas (*Chlamydomonas reinhardtii*),⁷ artrópodes (*Drosophila melanogaster*)⁸ e mamíferos (*Homo sapiens*).⁹ Curiosamente, ao longo da evolução eucariótica, algumas espécies acabaram por proliferar os genes de septinas enquanto que outras, especialmente as plantas, os eliminaram.¹⁰

Apesar de terem sido primeiramente descritas no processo de citocinese, atualmente, sabe-se que as septinas participam de diversos processos celulares, como: no posicionamento

do fuso durante a divisão celular,¹¹ no tráfego de vesículas,¹² na exocitose,¹³ na ciliogênese,¹⁴ e na dinâmica dos filamentos de actina e microtúbulos (Figura 2).^{15,16} Além de fornecerem rigidez à membrana celular, elas atuam como um suporte molecular (do inglês *molecular scaffold*) para recrutar determinadas proteínas para locais subcelulares específicos¹⁵ e ainda são capazes de criar barreiras de difusão na membrana.¹⁷ Devido a isso, as septinas são consideradas o quarto componente do citoesqueleto, juntamente com actina, microtúbulos e filamentos intermediários.¹⁸

Figura 2 – As septinas podem atuar como suporte molecular e/ou barreiras de difusão em diversos processos biológicos, como: (a) na divisão celular; (b) na formação de protuberâncias na membrana plasmática, no recrutamento de receptores e transportadores; e na base (c) do annulus do espermatozoide ou (d) de cílio.

Fonte: Adaptada de MOSTOWY.¹⁸

1.2 Septinas humanas

Atualmente, 13 genes de septinas humanas estão descritos, entretanto o número de proteínas codificadas por esses pode ser maior em certos casos devido à existência de *splicing* alternativo, aumentando consideravelmente o número de isoformas expressas.¹⁹ A fim de padronizar a nomenclatura dessas proteínas, optou-se por identificá-las pela sigla SEPT seguida da numeração do gene, que são ordenados de 1 a 12 e 14, sendo que a septina 13 é desconsiderada, pois sua descrição foi baseada em um pseudogene.²⁰ Ressalta-se que, no caso de isoformas, convencionou-se adicionar ainda a letra ‘v’ junto da sua respectiva numeração, obtendo, por exemplo, SEPT9_v7.²¹

Através da identidade estabelecida a partir da estrutura primária, pode-se classificar as septinas humanas em quatro grupos representados pelas septinas 2 (vermelho), 6 (azul), 7 (amarelo) e 3 (verde) como evidenciado na Figura 3. O grupo da SEPT2 é constituído por: SEPT1, SEPT2, SEPT4 e SEPT5; o da SEPT6, por SEPT6, SEPT8, SEPT10, SEPT11 e SEPT14; o da SEPT7, por somente ela; e o da SEPT3, por SEPT3, SEPT9 e SEPT12.²²

A partir do perfil de expressão proteica observado em tecidos humanos, verifica-se que enquanto as SEPT1 e SEPT3 são respectivamente encontradas nos linfócitos e tecidos neurais, a SEPT12 é exclusiva de testículos. Já a SEPT14 é expressa tanto nos

testículos quando no sistema nervoso. Por outro lado, as SEPT2, SEPT6, SEPT7 e SEPT9 são consideradas ubíquas e, por fim, as SEPT4, SEPT5, SEPT8, SEPT10 e SEPT11 abrangem uma grande variedade de tecidos.²³ Apesar dessa distribuição de expressão estar bem estabelecida, sabe-se pouco sobre a sua variação temporal. Alguns estudos, entretanto, evidenciam que os níveis de expressão de determinadas septinas são modificados consideravelmente durante o desenvolvimento cerebral.²⁴

Figura 3 – Árvore filogenética das septinas humanas evidenciando os quatro grupos representados pelas SEPT2 (vermelho), SEPT6 (azul), SEPT7 (amarelo) e SEPT3 (verde).

Fonte: Adaptada de KINOSHITA;²² CAO.²⁵

As septinas humanas estão relacionadas com certos processos fisiológicos, como: apoptose,^{26,27} reparo do DNA²⁸ e liberação de neurotransmissores.²⁹ Devido a isso, disfunções no padrão de expressão dessas proteínas estão usualmente relacionadas com várias doenças humanas, sendo as principais, cânceres e desordens neurológicas.³⁰ A SEPT5, por exemplo, ao interagir com a proteína Parkin acentua a doença de Parkinson.³¹ Além disso, as SEPT1, SEPT2 e SEPT4 encontram-se comumente acumuladas em estruturas citoplasmáticas em quadros patológicos, tais como: neurofibrilas e corpos de inclusão nas doenças de Alzheimer e Parkinson, respectivamente.³²

1.3 Domínio G

As septinas são filogeneticamente classificadas na classe das TRAFAC (do inglês *translation factor*) *P-loop* GTPases que incluem as superfamília das Ras GTPases e das proteínas motoras do citoesqueleto do tipo miosinas e cinesinas.³³ Deste modo, as

septinas são caracterizadas por possuírem um domínio de ligação ao nucleotídeo guanosina (domínio G) flanqueado por uma região amino-terminal (N-terminal) e carboxi-terminal (C-terminal).

Antes de explicar o domínio G das septinas é conveniente reportar o domínio das Ras GTPases, uma vez que a sua estrutura é considerada como a canônica. Basicamente, tal domínio possui seis fitas- β (folha- β central) rodeadas por cinco hélices- α e é descrito por cinco motivos estruturais denominados G1, G2, G3, G4 e G5 (Figura 4).³⁴ O motivo G1, definido pela sequência consenso $Gx_4GK(S/T)$ (motivo Walker A), está localizado na região de conexão entre a fita- β_1 e a hélice- α_1 e é responsável pela interação com os fosfatos- α e β das guanosinas difosfato (GDP) e trifosfato (GTP). O G2, localizado no início da fita- β_2 , é caracterizado pela presença de uma treonina que coordena o cofator Mg^{2+} , comumente denominada de treonina catalítica devido a sua elevada importância durante o processo de hidrólise do nucleotídeo. Já o G3, localizado no final da fita- β_3 e descrito pela sequência consenso Dx_2G (motivo Walker B), é responsável por interagir tanto com o Mg^{2+} quanto com o fosfato- γ do GTP. O G4, relatado por $(N/T)KxD$, evidencia a importância de resíduos de aminoácidos hidrofílicos na estabilização do anel guanina, sendo o mesmo localizado após a fita- β_5 . Por fim, o G5, localizado no *loop* que conecta a fita- β_6 com a hélice- α_5 , interage majoritariamente com o motivo G4, estabilizando indiretamente o anel guanina, possuindo a sequência $(S/C)A(K/L/T)$.³⁵

Figura 4 – Estrutura cristalográfica do domínio G da H-Ras p21 complexada a GDP e Mg^{2+} ressaltando os cinco motivos estruturais G (PDB ID 5P21).

Fonte: Adaptada de BOURNE.³⁴

O domínio G das septinas, apesar de extremamente semelhante, possui algumas diferenças em relação ao das Ras. No que se refere a motivos estruturais, tem-se que as septinas possuem somente o G1, G3 e G4 altamente conservados.³⁶ Entretanto, as septinas apresentam quatro motivos característicos denominados S1, S2, S3 e S4.³⁷ Tanto o motivo S1, identificado pela sequência Ex₄R, quanto o S2, descrito por DxR(V/I)Hx₃(Y/F)F(I/L)xP, e o S3, caracterizado por Gx₂Lx₃D, estão localizados entre os clássicos G3 e o G4. Já o S4, definido por WG, situa-se na região C-terminal do domínio G. A função exata de cada um desses novos motivos ainda não é bem compreendida.

Ao comparar a topologia das septinas com as das Ras, verifica-se a existência de determinadas inserções de estruturas secundárias (Figura 5).³⁸ Na porção N-terminal do domínio G, verifica-se uma nova hélice- α , denominada hélice- α_0 , que, em algumas septinas, possui um domínio polibásico descrito como responsável pela interação com certos fosfoinosítois presentes em membranas plasmáticas.^{39,40} Outra hélice- α está inserida entre a hélice- α_4 e a fita- β_6 , sendo, por isso, nomeada como hélice- $\alpha_{5'}$. Após a fita- β_6 , nota-se a presença de um motivo β -meander constituído pelas fitas- β_9 , β_{10} , β_7 , β_8 respectivamente.⁴¹ Atualmente sabe-se que as fitas- β_{10} e β_7 compõem uma única fita, mas, por motivos históricos, tal numeração foi mantida.⁴² Por fim, na porção C-terminal do domínio G, observa-se a existência de outra hélice- α , identificada como hélice- α_6 . Curiosamente, tal hélice possui um α -aneurismo⁴³ localizado exatamente no seu centro, possuindo, portanto, uma protuberância resultante de um padrão de interação do tipo hélice- π .

Figura 5 – Topologia do domínio G das (a) Ras e (b) septinas, indicando as hélices- α e fitas- β conservadas entre si em azul e verde respectivamente; além das inserções características em vermelho. (c) Representação estrutural do domínio G das septinas quando ligado a GTP e ao cofator Mg²⁺.

Fonte: Adaptada de WEIRICH.⁴⁴

Usualmente, proteínas que se ligam ao nucleotídeo guanosina estão associadas com a regulação de processos celulares e, por isso, requerem um mecanismo de controle de suas funções. A proteína G, por exemplo, regula a transmissão de sinais do espaço extra para o intracelular através de um mecanismo fundamentado na hidrólise do GTP. Quando a sua subunidade G_α (constituída parcialmente por um domínio G) está ligada a GDP, a proteína G forma um heterotrímero composto por três subunidades (G_α , G_β e G_γ) e está ‘desativada’ (estado *OFF*). Entretanto, ao interagir com o receptor acoplado a proteína G (do inglês *G Protein-Coupled Receptors*: GPCRs) em um processo estimulado por um agonista extracelular, realiza-se a troca do GDP para GTP e a proteína G é ‘ativada’ (estado *ON*). Logo em seguida, a subunidade G_α se dissocia das outras subunidades e passa a interagir com determinadas proteínas efetoras, transmitindo o sinal para o interior da célula.⁴⁵ A conversão de adenosina trifosfato (ATP) em monofosfato cíclico de adenosina (do inglês *cyclic adenosine monophosphate*: cAMP), por exemplo, é realizada por meio da interação da subunidade G_α ativa com a adenilato ciclase.⁴⁶ Eventualmente, o nucleotídeo guanosina é hidrolisado em um processo acelerado através da interação com proteínas ativadoras de GTPases (do inglês *GTPase Activating Proteins*: GAPs), e a subunidade G_α desativada, o que favorece a interação com as subunidades G_β e G_γ , reiniciando o ciclo.

Por causa da existência desses dois estados (*ON* e *OFF*), as proteínas G são comumente descritas como interruptores moleculares (do inglês *molecular switches*). Entretanto, tal mecanismo se estende a outras proteínas, como as Ras GTPases que também atuam com a transmissão de sinais moleculares. Ao contrário das proteínas G, as Ras apresentam apenas uma única ‘subunidade’ (equivalente ao G_α) que é constituída somente pelo domínio G canônico, o que resulta na sua usual denominação de ‘pequenas’ GTPases (do inglês *small GTPases*). De modo semelhante, proteínas auxiliares, denominadas fatores de troca do nucleotídeo guanina (do inglês *Guanine nucleotide Exchange Factors*: GEFs), são responsáveis por realizar a troca do nucleotídeo GDP (estado *OFF*) para GTP (estado *ON*) e, por consequência, ativar as Ras. Posteriormente, a hidrólise do nucleotídeo é realizada com o auxílio das GAPs de maneira semelhante a proteína G, fechando o ciclo.⁴⁷

Através da análise das mudanças conformacionais existentes nas estruturas das Ras quando ligadas aos nucleotídeos GDP e GTP, foi possível correlacionar a importância de cada um dos motivos do domínio G com o mecanismo do *molecular switch*. Consequentemente, a região do motivo G2 passou a ser chamada *switch I*, a do G3 de *switch II* e a do G1 de *P-loop* em alusão a sua estrutura do tipo volta (do inglês *loop*) e aos fósforos presentes nos nucleotídeos (símbolo atômico P).⁴⁸ Portanto, o *switch I* é sempre o responsável por interagir tanto com o cofator Mg^{2+} (através da treonina catalítica) quanto com o fosfato- γ ; o *switch II* pela estabilização também do fosfato- γ , mas através de uma glicina; e o *P-loop* por interagir com os fosfatos- α e β dos nucleotídeos.³⁴

As mudanças conformacionais verificadas em ambos os *switches* durante o processo

de hidrólise são usualmente esquematizada através de um mecanismo do tipo *loaded spring*, onde as interações realizadas entre o fosfato- γ e os dois *switches* é representada por uma força elástica (Figura 6).⁴⁷ Deste modo, quando ocorre a liberação do fosfato- γ , tem-se que ambos os *switches* adquirem um alto grau de flexibilidade, enquanto o restante da estrutura permanece o mesmo. A partir desse modelo, salienta-se que ambos os *switches* possuem sempre uma estrutura bem definida quando ligados a GTP e uma elevada diversidade conformacional quando ligados a GDP.⁴⁸

Figura 6 – Diagrama do mecanismo de hidrólise do tipo *loaded spring* evidenciando (a) a rigidez dos *switches* no estado com GTP e (b) a sua flexibilidade no com GDP.

Fonte: Adaptada de VETTER;⁴⁷ WEIRICH.⁴⁴

Apesar da relativa flexibilidade dos *switches* no estado com GDP, as Ras ainda possuem uma alta afinidade ao nucleotídeo ($k_D \sim 10$ pM), o que dificulta uma dissociação espontânea mesmo depois da hidrólise. Para evitar esse problema, as GEFs, ao interagirem com as regiões dos *switches*, são responsáveis por perturbar o posicionamento do P-loop e do cofator Mg^{2+} , promovendo a liberação do GDP.⁴⁷ Após a inserção de uma nova molécula de GTP e do cofator Mg^{2+} , os *switches* da Ras voltam a adquirir uma estrutura rígida, mas, por outro lado, o processo de hidrólise ainda é bastante lento ($\sim 10^{-5} \text{ s}^{-1}$), o que justifica a utilização das GAPs. Tais proteínas são responsáveis por estabilizar o estado intermediário da hidrólise por meio da inserção de um resíduo de arginina em uma região próxima aos fosfatos- β e γ por meio de um motivo estrutural conhecido como *Arg-finger*, acelerando consideravelmente a reação.⁴⁸

Por se assemelharem as Ras GTPases, poderia-se supor que as septinas também possuíssem um mecanismo do tipo *molecular switch*. Entretanto, tais proteínas possuem algumas peculiaridades que dificultam tal analogia. Primeiro, a região do *switch I* é umas das regiões menos conservadas entre as septinas humanas, o que complica a compreensão da sua importância durante a hidrólise. Segundo, em decorrência disso, as septinas do grupo da SEPT6 não apresentam a treonina conservada do motivo G_2 (localizado teoricamente no *switch I*), fato que resulta na perda da atividade hidrolítica,⁴⁹ sendo, por tanto, impossível a existência de um estado ligado a GDP (estado *OFF*) nesse grupo. Terceiro, tais proteínas

usualmente regulam a sua atividade hidrolítica através de um processo de dimerização dos domínios G,³⁸ um mecanismo extremamente diferente das Ras e das proteínas G. Na verdade, é por esse motivo que as septinas são consideradas proteínas G ativadas por dimerização (do inglês *G proteins Activated by Dimerization: GADs*).⁵⁰

As GADs apresentam uma complementaridade estrutural intrínseca e, ao contrário das Ras GTPases, não são reguladas por GEFs e GAPs, uma vez que possuem baixa afinidade aos nucleotídeos guanina ($k_D \sim \mu\text{M}$) e o hidrolisam, na maioria das vezes, ao interagir com determinadas proteínas efectoras. Por conta disso, supõem-se que a função biológica das GADs esteja provavelmente relacionada com a situação em que os dímeros estejam ligados a GTP (análogo estado *ON*), mas isso ainda não está muito claro. De qualquer forma, sabe-se que a dimerização é um processo fundamental durante a hidrólise dos nucleotídeos, pois é através dela que toda a maquinaria catalítica (regiões dos *switches* principalmente) é corretamente posicionada. Em muitos casos, uma subunidade é ainda responsável por fornecer resíduos essenciais à hidrólise do nucleotídeo da outra. Na realidade, tais resíduos podem atuar tanto diretamente na reação de catálise, quanto na estabilização da estrutura do dímero como um todo.⁵⁰

Figura 7 – Esquema do ciclo funcional das proteínas G, destacando as proteínas (a) semelhantes às Ras e as (b) ativadas por dimerização (GADs). Note que ao contrário das Ras, as GADs não precisam de GEFs e GAPs para realizar a troca e a hidrólise do nucleotídeo respectivamente. Porém, assume-se que ambas possuem o estado *ON* quando ligadas a GTP e *OFF*, a GDP.

Fonte: Adaptada de WITTINGHOFFER.⁴⁸

No caso das septinas, o processo de dimerização pode ocorrer via dois tipos de interfaces oriundas do próprio domínio G. A primeira, denominada interface-G, é estabelecida através do contato de regiões próximas aos sítios ativos de cada subunidade, sendo extremamente dependente dos nucleotídeos guanosina que são arranjados sempre na configuração *head-to-tail*.⁵⁰ A segunda, chamada de interface-NC, é formada através do

contado de hélices- α_0 , α_2 e α_6 localizadas, respectivamente no N- e C-terminal do domínio G de cada subunidade.³⁸ Por conveniência, tais interfaces são usualmente esquematizadas na forma de um semi-anel, como mostrado na Figura 8. Ressalta-se que, em ambos os casos, o processo de dimerização pode ocorrer entre subunidades idênticas (homotípica) ou diferentes (heterotípica), sendo a importância fisiológica de cada caso ainda não totalmente compreendida.⁴²

Figura 8 – Representação estrutural e esquemática das interfaces (a) -G e (b) -NC utilizadas durante a dimerização de septinas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A interface-G é majoritariamente estabilizada através de interações estabelecidas com os nucleotídeos guanosina. Consequentemente, a simples perda um único fosfato inorgânico durante a hidrólise acaba afetando significativamente. A caracterização do estado ligado a GTP pode ser realizada a partir da estrutura em alta resolução (1.86 Å) da SEPT3 complexada a guanosina imidotrifosfato (GppNHp), um análogo de baixa hidrólise do GTP (PDB ID 4Z51) como mostrado na Figura 9a. Nela é possível verificar a importância do *P-loop* na estabilização dos fosfatos da guanosina, do *switch I* na coordenação do Mg^{2+} , do resíduo H₁₈₃ (fornecido pela outra subunidade) na interação com o fosfato- α e, principalmente, do resíduo K₁₀₁ na estabilização do fosfato- γ , fato que pode estar relacionado com o processo de hidrólise já que a mesma está muito próximo da treonina catalítica (T₁₀₂). Ressalta-se que normalmente se espera uma molécula de água na extremidade desse K₁₀₁,⁴² como verificado no caso da estrutura da SEPT2 com GppNHp (PDB ID 3FTQ),⁴¹ já que é a partir de tal água que se inicia o processo de hidrólise. É interessante notar, a partir desse exemplo, que talvez o mecanismo da reação da hidrólise seja particular de cada septina.

O estado ligado com GDP, exemplificado pela estrutura em alta resolução (1.83 Å) da SEPT3 complexada a GDP (PDB ID 4Z54), possui praticamente as mesmas interações verificadas no caso de SEPT3 com GppNHp. Entretanto, devido a perda do fosfato, o *switch I* acaba adquirindo uma maior flexibilidade, o que resulta em uma nova conformação

da K₁₀₁ e S₇₀ (Figura 9b). Mesmo assim, o cofator Mg²⁺ permanece ligado e com uma coordenação extremamente semelhante ao caso com GppNHp, com exceção da presença de uma nova molécula de água na antiga posição do fosfato- γ .

Figura 9 – Interações estabelecidas pelo *P-loop* (amarelo) no caso de SEPT3 ligada a (a) GppNHp (PDB ID 4Z51) e (b) GDP (PDB ID 4Z54). Note que, após a hidrólise do fosfato- γ , uma nova molécula de água é responsável por completar a esfera de coordenação do Mg²⁺. Cada subunidade está colorida com uma tonalidade de verde diferente.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tanto na situação com GDP quanto na com GTP, o anel guanina é sempre estabilizado pelo motivo G₄ conforme o esperado. Entretanto, diferentemente das Ras, novas interações características de septinas são descritas (Figura 10). No caso específico de SEPT3, verifica-se uma a partir da G₂₆₅, D₂₁₀ e outra pela T₂₁₁ oriunda da outra subunidade. Além disso, nota-se uma interação entre os resíduos K₂₀₈ e R₂₈₀ com o anel, formando um clássico *stacking*. Na realidade o resíduo R₂₈₀ ainda é responsável por interagir com o E₂₁₆ da outra subunidade, um processo fundamental para a estabilização do dímero.⁴²

Outro resíduo extremamente essencial à dimerização é uma tirosina (Y₂₅₈) localizada na fita- β_7 , como visto na estrutura da SEPT2 (Figura 10b). Curiosamente, essa *Tyr* está presente em todas as septinas com exceção das do grupo da SEPT3, que possuem uma *Thr* na posição correspondente. Interessantemente, ao realizar a mutação dessa *Thr* característica para uma *Tyr* na SEPT3, induz-se a sua dimerização em solução, um resultado intrigante já que tal septina (e todas as do seu grupo) são usualmente monoméricas *in vitro*. Acredita-se que uma típica interação da *Tyr* com o anel guanina, reportada nas estruturas da SEPT2 (PDB ID 2QNR) e SEPT7 (PDB ID 3T5D), foi recuperada na SEPT3_{T282Y}, estabilizando a interface G e possibilitando a sua dimerização.⁵¹

Deste modo, torna-se clara a necessidade da dimerização durante a hidrólise do

nucleotídeo guanosina. Além de possibilitar o correto posicionamento do *switches* no sítio ativo, tal processo ainda possibilita a inserção de vários resíduos de aminoácidos oriundos de uma das subunidades em regiões críticas à hidrólise da outra. Curiosamente, todas as septinas possuem atividade hidrolítica, com exceção das do grupo da SEPT6, que não possuem uma porção do *switch I* que engloba a treonina catalítica.⁴⁹ Entretanto, mesmo assim, as mesmas ainda possuem a capacidade de dimerizar,³⁸ promovendo o questionamento da importância da hidrólise na função das septinas.

Figura 10 – Interações estabelecidas na região do anel guanina no caso da (a) SEPT3 (PDB ID 4Z54) e (b) SEPT2 (PDB ID 2QNR). Para identificar cada uma das subunidades, estas foram coloridas em duas diferentes tonalidades (claro e escuro) numa mesma cor.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Motivado pela proximidade filogenética com as β -tubulinas,¹⁰ especulou-se inicialmente que talvez a ligação do nucleotídeo, no caso das septinas, estivesse relacionada com o processo de formação de filamentos.² De maneira idêntica as β -tubulinas, a polimerização seria estimulada no estado ligado a GTP e desestimulada no com GDP.⁵² Interessantemente, tal proposta foi comprovada no caso da septina 2 de humano⁵³ e do anfíbio *Xenopus*.⁵⁴ Entretanto, tais experimentos foram realizados em uma condição muito distante dos heterocomplexos de septinas fisiológicos, o que dificulta a generalização do mecanismo.⁵⁵

A importância do processo de hidrólise na função das septinas ainda não é está muito clara. Heterocomplexos isolados de vários organismo possuem uma razão estequiométrica de GDP maior que a GTP,^{56–58} indicando que o estado com GDP também estabilizaria o filamento.⁴⁹ Em septinas de leveduras, sabe-se que a perda da habilidade de polimerizar somente ocorre quando a ligação dos nucleotídeos é de alguma forma interrompida.⁵⁹ Além

disso, acredita-se que a hidrólise talvez esteja relacionada com o processo de interação das septinas com fosfoinosítois presentes na membrana plasmática, como no caso de SEPT4.⁶⁰

O fato é que a única diferença estrutural significativa reportada entre os estados com GDP e GTP se refere ao deslizamento da fita- β_3 , fenômeno verificado nas estruturas da SEPT2 (PDB IDs: 2QNR e 3FTQ, ligadas com GDP e GppNHp respectivamente) e da *Sm*SEPT10 (PDB IDs: 4KV9 e 4KVA, ligadas com GDP e GTP γ S respectivamente), uma septina de *Shistosoma mansoni* homóloga a SEPT6 e que também não possui atividade hidrolítica.⁶¹

No caso de *Sm*SEPT10, verifica-se um deslizamento da fita- β_3 em relação as fita- β_1 por exatamente dois resíduos em direção a interface-G ao hidrolisar o GTP, como mostrado na Figura 11. Para tal deslizamento ocorrer, verifica-se a necessidade de uma modificação em aproximadamente 20 interações de hidrogênio estabelecidas entre essas fitas, um processo que é provavelmente facilitado pela existência da sequência KL(K/R)L na fita- β_3 . Quando ligada ao GTP, uma das interações da folha- β central é constituída pelos resíduos Y₈₅-L₉₆-F₄₂. Entretanto, quando ligada ao GDP, o deslizamento de 2 resíduos provoca uma modificação nessa interação, que passa a ser Y₈₅-L₉₄-F₄₂. Deste modo, verifica-se uma invariância de uma *Leu* no centro dessa interação, o que é somente possível a partir da sequência K₉₃-L₉₄-K₉₅-L₉₆ na fita- β_3 .⁶¹

Figura 11 – Diagramas das interações de hidrogênio estabelecidas entre as fitas- β_1 , β_2 e β_3 destacando o deslizamento das fitas (seta preta) no caso de (a) *Sm*SEPT10 e (b) SEPT2. Representações esquemáticas do mecanismo do deslizamento da fita- β_3 em direção a interface-G observado na (c) *Sm*SEPT10 e (d) SEPT2 evidenciando a importância dos nucleotídeos e do íon Mg²⁺.

Fonte: Adaptada de VALADARES;⁴² BROGNARA.⁶²

Além disso, a ausência do Mg^{2+} na estrutura com GDP pode ter sido crítica para a observação do deslizamento da fita- β_3 . Na situação com GTP, o resíduo E₁₀₀ localizado na fita- β_3 é responsável por coordenar diretamente o Mg^{2+} , um processo que normalmente é realizado indiretamente através de uma molécula de água e um resíduo de Asp.⁴² De qualquer forma, ao perder o íon, tem-se que o E₁₀₀ adquire uma maior flexibilidade e acaba sendo deslocado em direção a interface-G, promovendo o deslizamento da fita- β_3 .⁶¹ O que é consistente com inexistência do deslizamento na estrutura da SEPT3 (PDB ID 4Z54) ligada ao GDP e, principalmente, ao Mg^{2+} .

Uma vez que a SmSEPT10 não possui atividade hidrolítica, espera-se que ela esteja sempre ligada ao GTP, tornando o fenômeno do deslizamento um artefato. Entretanto, ao examinar as estruturas da SEPT2, que é hidroliticamente ativa,⁵³ nota-se novamente o deslizamento, o que refuta a sua descrição como um simples artefato. Ao contrário de SmSEPT10, no caso de SEPT2, verifica-se que as fitas- β_2 e β_3 acabam por se deslocar juntas em relação a fita- β_1 em direção a interface-G. Por consequência, uma modificação de aproximadamente metade das interações de hidrogênio verificadas em SmSEPT10 tornam-se necessárias, como visto na Figura 11. Contudo, deve-se ter muito cuidado ao analisar a região da fita- β_2 da estrutura da SEPT2 ligada com GDP, devido a baixa qualidade de seu mapa de densidade eletrônica.⁴²

De qualquer modo, o deslizamento das fitas aparenta ser um mecanismo fisiológico que possivelmente é responsável por realizar uma comunicação entre as interfaces-NC e -G. Na verdade, sugere-se que tal comunicação esteja relacionada com a exposição da hélice- α_0 e, consequentemente, com a interação das septinas com membranas⁴² através de um mecanismo dependente de GTP semelhante aos fatores de ribosilação do ADP (do inglês *ADP Ribosylation Factors: Arfs*).⁶³ Entretanto, deve-se ter em mente que, mesmo sendo uma *small GTPase*, as Arfs não possuem a característica de formarem filamentos, o que não é definitivamente o caso das septinas.

Por último, a dimerização das septinas pode ocorrer também via interface-NC do domínio G. Nesse caso, ao invés do contato das subunidade ser estabelecido entre regiões próximas aos sítios ativos, tem-se que o mesmo ocorre essencialmente por meio das hélices- α_0 , α_2 e α_6 .³⁸ Infelizmente, a importância da hélice- α_0 durante a interação das subunidades não é completamente compreendida devido a sua inexistência na maioria das estruturas de septinas disponíveis. Entretanto, ao comparar as estruturas da SEPT2 com a hélice- α_0 (PDB ID 2QA5) e sem (PDB ID 2QNR), verifica-se que o restante da interface-NC permanece estruturalmente inalterada. Tal fato sugere que a interface-NC seria estabilizada majoritariamente pelas hélices- α_2 e α_6 através de diversas pontes salinas estabelecidas entre as subunidades.⁴² Curiosamente, dois padrões de interações são verificados como evidenciado na Figura 12. No padrão canônico, exemplificado pela SEPT2 (PDB ID 2QNR), as hélices- α_6 de cada subunidade estão mais distantes do que

no caso visualizado exclusivamente na SEPT3 (PDB ID 4Z54),⁵¹ sendo a relevância dessa diferença desconhecida.⁴²

Figura 12 – Padrões de interações verificados na interface-NC de (a) SEPT2 (vermelho, PDB ID 2QNR) e (b) SEPT3 (verde, PDB ID 4Z54). Cada subunidade está colorida com a mesma cor, mas em tonalidades diferentes para serem distinguidas.

Fonte: Adaptada de MACEDO.⁵¹

1.4 Heterocomplexos e filamentos

Quando as septinas estão em um ambiente de elevada força iônica, verifica-se a presença de complexos hetero-oligoméricos altamente organizados, descritos como sendo as unidades base de construção de tais estruturas.³⁸ Entretanto, para exercer a sua função como um elemento citoesquelético, as septinas requerem a formação de estruturas mais complexas.¹⁸ O hexâmero constituído pelas SEPT2-6-7 foi o primeiro a ser reportado⁶⁴ e, devido a sua estrutura cristalográfica e imagens de microscopia eletrônica de partícula única,³⁸ o mais compreendido atualmente.

Figura 13 – Estrutura cristalográfica do heterocomplexo formado pela SEPT2 (vermelho), SEPT6 (azul) e SEPT7 (amarelo) evidenciando os seus respectivos nucleotídeos (PDB ID 2QAG).

Fonte: Adaptada de SIRAJUDDIN.³⁸

Ao analisar a rede cristalina do heterocomplexo SEPT2-6-7, verifica-se que o contato entre cada subunidade desse complexo é realizada de maneira alternada por meio das interfaces-G e -NC do domínio G. Por consequência, identifica-se duas dimerizações homotípicas: uma via interfaces-NC de SEPT2 e outra via interfaces-G de SEPT7; e duas dimerizações heterotípicas: uma via interfaces-NC de SEPT6-7 e outra via interfaces-G de SEPT2-6, como mostrado na Figura 13. Além disso, enquanto que as interfaces-G de SEPT7 possuem exclusivamente GDP, a de SEPT2-6 possuem tanto GDP quando GTP, já que a SEPT6 é cataliticamente inativa.⁴⁹

Os N-terminais das SEPT2-6-7, apesar de pequenos (~ 30 resíduos), estão majoritariamente ausentes na estrutura cristalográfica. Apesar disso, é possível notar um contato direto de uma pequena porção do N-terminal de SEPT6 com o domínio G de SEPT7, sugerindo que talvez os N-terminais sejam importantes para a interação das subunidades.³⁸ Surpreendentemente, os C-terminais também estão desordenados, o que não era esperado, uma vez que eles são preditos como *coiled-coils*.⁶⁵ Entretanto, isso pode ser explicado pela existência de um *linker* flexível localizado entre o final do domínio G e o início do próprio *coiled-coil*, fato que possivelmente resulta em uma diversidade de orientações para os *coiled-coils*;³⁸ ou talvez pela falta de parceiros essenciais a própria estabilidade estrutural, como as proteínas que se ligam as Rho GTPases (do inglês *Binders Of Rho GTPases*: Borgs).⁶⁴

Imagens de microscopia eletrônica do complexo SEPT2-6-7 evidenciaram a existência de uma estrutura linear formada por seis subunidades orientadas de maneira extremamente semelhante ao do visualizado na estrutura cristalográfica. Apesar disso, devido a impossibilidade da realização de uma correspondência direta, a ordem das septinas nesse hexâmero foi determinada a partir da fusão da SEPT2 com uma proteína de MBP (do inglês *Maltose Binding Protein*: MBP). Deste modo, a partir do posicionamento da MBP, os autores inferiram que a SEPT2 estava localizada na posição central do hexâmero SEPT2-6-7 (Figura 14b). Consequentemente, concluiu-se que a ordem das septinas nesse heterocomplexo é dada por: 7-6-2-2-6-7.³⁸

Figura 14 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão obtidas através de constatação negativa (a) do hexâmero SEPT2-6-7 e (b) de SEPT2MBP-6-7, mostrando o posicionamento central da SEPT2.

Fonte: Adaptada de SIRAJUDDIN.³⁸

Posteriormente, verificou-se a possibilidade da SEPT9 ocupar a extremidade do heterocomplexo SEPT2-6-7, promovendo a formação de um octâmero. Devido ao padrão alternado das interface-G e -NC, espera-se que a SEPT9 interaja com a SEPT7 através de uma interface-G, expondo a sua interface-NC ao solvente.⁶⁶ Deste modo, a sequência do octâmero foi assumida como: 9-7-6-2-2-6-7-9.⁶⁷ Devido à atividade hidrolítica de SEPT9, tem-se que a interface-G estabelecida entre SEPT7-9 possuiria somente moléculas de GDP.⁶⁶ A presença da SEPT9 no octâmero é explicada por uma provável importância sua durante os últimos estágios da divisão celular, atuando preferencialmente na formação de barreiras de difusão. Curiosamente, ao deletar tal septina (recuperando o tradicional hexâmero SEPT2-6-7), tem-se que os estágios iniciais da divisão, caracterizados principalmente pela formação das estruturas anelares, não são afetados.⁶⁷ Entretanto, como a SEPT9 possui diversas isoformas, tem-se que a compreensão da sua função exata no octâmero se torna extremamente complexa.⁶⁶

Recentemente, comprovou-se que a ordem do hexâmero SEPT2-6-7 está invertida. Através da fusão da SEPT2 com MBP e de um processamento mais adequado das imagens, foi possível verificar que a SEPT2 está localizada na extremidade desse heterocomplexo (Figura 15), promovendo uma sequência dada por: 2-6-7-7-6-2.⁶⁸ Similarmente, quando a SEPT5 (pertencente ao mesmo grupo da SEPT2 e, por isso, com previsão de ocupar a mesma posição) foi fusionada com MBP, verificou-se o seu posicionamento terminal no hexâmero. Deste modo, ao invés da interface-G de SEPT7 estar exposta ao solvente (Figura 13),³⁸ tem-se que agora a interface-NC de SEPT2 (ou alternativamente de SEPT5) ocupa a extremidade do hexâmero, um resultado coerente uma vez que as interfaces-NC são extremamente suscetíveis à força iônica já que são estabilizadas essencialmente por pontes salinas. Além disso, no caso do octâmero SEPT2-6-7-9, tem-se que a SEPT9 ocupa a posição central, resultando em uma sequência do tipo: 2-6-7-9-9-7-6-2.⁶⁹

Figura 15 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão obtidas através de contraste negativa do hexâmero SEPT2-6-7, onde a SEPT2 está fusionada a MBP. Note, que devido a existência de um *linker*, a MBP é capaz de adotar diversas posições ao redor da SEPT2 localizada na extremidade. Ressalta-se que, durante o processamento dos dados, a MBP foi sempre posicionada na extremidade superior do hexâmero.

Fonte: MENDONÇA.⁶⁸

Considerando a classificação das septinas nos quatro grupos, Kinoshita propôs que as septinas do mesmo grupo poderiam ser substituídas nas mesmas posições nos heterocomplexos, sugerindo a existência de 60 combinações diferentes (Figura 16). Deste modo, a SEPT2, por exemplo, poderia ser substituída pela SEPT1, SEPT4 ou SEPT5 no octâmero SETP2-6-7-9. A SEPT7, por ser única em seu grupo, seria insubstituível, estando presente em todos os heterocomplexos.²² Ressalta-se que tais suposições são usualmente denominadas de ‘Regras de Kinoshita’ e que, apesar de observadas frequentemente, são refutadas pela existência de alguns heterocomplexos que não seguem tal padrão de substituição.^{70,71}

Figura 16 – Diagrama de substituição das septinas nos heterocomplexos de acordo com as ‘Regras de Kinoshita’ que sugerem a existência de 60 diferentes combinações.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em condições fisiológicas, os heterocomplexos de septinas tendem a polimerizar através de interações estabelecidas entre as suas extremidades, resultando na formação de filamentos.⁷² Devido a existência de uma sequência palindrômica das subunidades no *core* (hexâmeros ou octâmeros), diz-se que tais filamentos são apolares, já que as suas terminações são indistinguíveis;⁴² diferentemente dos filamentos de actina e microtúbulos que são polares, por possuem uma terminação positiva e outra negativa, que são relacionadas com as diferentes taxa de polimerização em cada uma das suas extremidades.¹⁸ Na verdade, a existência de um filamento de septinas perfeitamente apolar tem sido questionada por meio da verificação da existência de diversas isoformas no mesmo filamento.⁶⁶ De qualquer modo, após a associação dos heterocomplexos em filamentos, tem-se que estes ainda podem se parar lateralmente, resultando na formação de *bundles*, que, por sua vez, podem ainda formar estruturas anelares (Figura 17).

Figura 17 – Representação esquemática dos filamentos, *bundles* e anéis formados a partir do heterocomplexo base.

Fonte: Adaptada de MOSTOWY.¹⁸

O mecanismo de controle da polimerização das septinas infelizmente não é totalmente compreendido. Como citado anteriormente, enquanto alguns experimentos indicam uma provável influência da hidrólise do nucleotídeo guanosina na polimerização,^{53,54} outros sugerem que a composição dos heterocomplexos seja determinante na formação de estruturas de mais alta ordem. Um exemplo seria as barreiras de difusão, já que as mesmas requerem a presença da SEPT9 no hexâmero SEPT2-6-7.⁶⁷ A polimerização em *bundles*, por outro lado, aparenta ser regulada através da associação das septinas com outras proteínas parceiras, como a Borg3 e a proteína controladora da divisão celular 42 (do inglês *Cell Division Control protein 42*: Cdc42). Essencialmente, acredita-se que a interação com a Borg3 induza a produção de filamentos de septinas mais espessos, o que seria fruto de uma provável formação de *bundles*. Além disso, tal processo é ainda regulado negativamente a partir da Cdc42,⁷³ uma proteína homóloga a Ras (do inglês *Ras Homologous protein*: Rho), através de um clássico *molecular switch*.³⁵ Quando ligada a GTP (estado *ON*), a Cdc42 é capaz de interagir com a Borg3 e retirá-la dos filamentos, desmontando os possíveis *bundles*. Apesar de extremamente interessante, pouco se sabe sobre os detalhes por trás dessa polimerização.

2 JUSTIFICATIVA

A fim de compreender a arquitetura e dinâmica das septinas, realizou-se a caracterização estrutural e biofísica do domínio G da septina 7 humana e de seus complexos com as septinas 3 e 9. Devido ao fato da septina 7 ser única em seu grupo, tem-se que a mesma é insubstituível e, portanto, está presente em todos os heterocomplexos. Apesar das estruturas cristalográficas, pouco se sabe sobre os elementos moleculares responsáveis por tal unicidade; justificando a obtenção de novas estruturas (especialmente pelo fato das disponíveis serem de baixa resolução). Além disso, ainda que esteja claro que as septinas 3 e 9 interajam com a 7, não se tem nenhuma caracterização biofísica ou estrutural da termoestabilidade dos dímeros; investigação realizada pela primeira vez neste trabalho. Por motivos de maior clareza, optou-se em dividir a discussão dos resultados em três capítulos: ‘Domínio G de SEPT7’, ‘Estabilidade térmica de dímeros’ e ‘Dependência do estado oligomérico em função da força iônica’.

3 METODOLOGIA

3.1 Produção heteróloga

3.1.1 Clonagem e expressão heteróloga

Este trabalho envolveu a produção heteróloga de três septinas humanas: SEPT7 (código *GenBank* NM_001788.5), SEPT3 (NM_019106.5) e SEPT9 (AF123052.1). Entretanto, devido a dificuldade de expressar tais septinas inteiras e solúveis, optou-se por trabalhar com construções truncadas. No caso da septina 7, optou-se por uma construção constituída pelo domínio GTPase sem a hélice- α_0 (SEPT7G), enquanto que para as septinas 3 e 9, manteve-se tal domínio GTPase, mas com os respectivos C-terminais (SEPT3GC e SEPT9GC), já que os mesmos são relativamente curtos (cerca de 20 resíduos). Visando compreender também a importância da troca de um aminoácido na estabilização da interface G da SEPT3GC, utilizou-se uma construção mutante na qual uma tirosina substituiu a treonina 282 (SEPT3GC_{T282Y}).

Vetores de coexpressão pETDuet-1 (*Novagen*) foram utilizados para coexpressar os seguintes heterodímeros de septinas: SEPT7G-3GC, SEPT7G-3GC_{T282Y} e SEPT7G-9GC. Para tal, inseriu-se sempre a sequência de DNA codificante (CDS) de SEPT7G no primeiro sítio múltiplo de clonagem (MSC1) e a SEPT3GC, SEPT3GC_{T282Y} ou SEPT9GC no segundo (MSC2). Deste modo, a SEPT7G recombinante sempre possuirá a cauda de histidina no seu N-terminal, enquanto que as outras septinas não. Além disso, devido a inserções de resíduos intrínsecos do vetor nas presentes construções, decidiu-se, por motivos de controle, purificar a SEPT7G sozinha utilizando esse mesmo vetor.

Uma vez que a SEPT9GC não possui uma cauda de histidina no vetor pETDuet-1, optou-se, pela necessidade de uma proteína controle, por purificá-la isoladamente, através da expressão no vetor pET SUMO (*Thermo Fisher Scientific*). Neste, a CDS de SEPT9GC foi fusionada ao CDS de uma pequena proteína relacionada à ubiquitina (do inglês *Small Ubiquitin-related Modifier*: SUMO) no seu N-terminal. Como a SUMO expressa por esse vetor possui uma cauda de histidinas, é possível inicialmente purificar SEPT9GC por uma cromatografia de afinidade ao níquel. Em seguida, para eliminar a proteína de fusão, realizar-se uma etapa de clivagem com a protease apropriada e recupera-se a SEPT9GC isolada a partir de uma segunda cromatografia de afinidade, uma vez que, por não possuir uma cauda de histinas, a mesma não permanecerá retida na coluna, ao contrário da SUMO.

Na [Tabela 1](#), evidencia-se todas as construções utilizadas juntamente dos respectivos vetores, sítios de restrição e numerações equivalentes à CDS e aos resíduos de aminoácidos correspondentes. Os clones utilizados já haviam sido previamente construídos no Grupo e estavam disponíveis para uso, assim toda a etapa de clonagem foi omitida neste trabalho.

Tabela 1 – Construções para expressão das septinas utilizadas, seguidas de seus vetores, sítios de restrição, numeração equivalente das sequências de DNA codificantes (CDS) e respectivos resíduos de aminoácidos.

Construção	Vetor	Sítios	DNA	Resíduos
7G	pETDuet-1 (MSC1)	<i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I	335-1,147	48-318
3GC	pETDuet-1 (MSC2)	<i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I	313-1,188	59-350
3GC _{T282Y}	pETDuet-1 (MSC2)	<i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I	313-1,188	59-350
9GC	pETDuet-1 (MSC2)	<i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I	1,610-2,479	279-568
9GC	pET SUMO	<i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III	1,610-2,479	279-568

Fonte: Elaborada pelo autor.

Antes de realizar a transformação das linhagens bacterianas com os vetores de interesse, teve-se a necessidade de primeiro torná-las competentes através de um tratamento com CaCl₂. Para tal, inoculou-se uma colônia isolada de *Escherichia coli* da linhagem desejada em 2 ml de *Lysogeny Broth* (LB), incubando-a durante 16 h, a 37 °C e sob uma agitação de 250 rpm. Após, realizou-se a transferência desse inóculo para 100 ml de meio LB, deixando-o a 37 °C e 250 rpm até se obter uma densidade celular correspondente a uma absorção, monitorada em 600 nm, entre 0.6 a 0.7. Em seguida, deixou-se as cultura celular sob um banho de gelo durante 10 min e prosseguindo com uma centrifugação a 5,000×g por 10 min a 4 °C. Após descartar o sobrenadante, ressuspendeu-se as células em 20 ml de 100 mM MgCl₂ gelado e as centrifugou-se novamente. O mesmo procedimento foi repetido para 50 ml de 100 mM CaCl₂ gelado, entretanto, ao invés de centrifugar de imediato, manteve-se as células sob um banho de gelo durante 30 min, misturando-as cuidadosamente a cada 10 min. Por fim, após centrifugar novamente, ressuspendeu-se as bactérias em 5 ml de 100 mM CaCl₂ e 15% de glicerol gelado. Aliquotas de 100 µl foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C.

Inicialmente, transformou-se a linhagem de *Escherichia coli* DH5-α (*Thermo Fisher Scientific*) para realizar a propagação dos vetores de interesse e, assim, analisar a integridade das sequências dos insertos. Deste modo, 100 ng de DNA foram adicionados aos 100 µl das bactérias competentes dessa linhagem e incubados durante 30 min sob banho de gelo. Posteriormente, foi realizado um choque térmico a fim de promover a inserção do DNA na bactéria, deixando a mistura a 42 °C por 2 min e no banho de gelo por 3 min. Depois de acrescentar 200 µl de meio LB, incubou-se as bactérias transformadas por 1 h, a 37 °C e 250 rpm e, em seguida, foi feito o plaqueamento em um meio LB Agar contendo 50 µg/ml do antibiótico de seleção do vetor, ou seja, ampicilina para o pETDuet-1 e canamicina para o pET SUMO. Por fim, as placas foram incubadas a 37 °C por 16 h.

Uma colônia isolada de *E. coli* DH5-α recém transformada foi inoculada em 10 ml de LB contendo os antibióticos de seleção durante 16 h, 37 °C e 250 rpm, sendo a

cultura resultante utilizada para a extração de DNA plasmidial através do kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) de acordo com as orientações do fabricante. Posteriormente, a confirmação da presença do inserto foi realizada por análise de restrição. A reação de digestão foi preparada usando 500 ng de DNA plasmidial, 10 U de cada enzima restrição (de preferência da *Thermo Fisher Scientific*) e 1X do tampão *FastDigest Green* (*Thermo Fisher Scientific*) para um volume final de 10 µl. Tal reação foi mantida durante 4 h a 37 °C e analisada em gel de agarose 0.8% (m/v) em TAE (Tris-Acetado-EDTA) corado com brometo de etídeo.

Confirmada a presença do inserto, verificou-se a integridade da sua sequência através de um sequenciador automático *Genetic Analyzer 3130* (*Applied Biosystems*) baseado no método de Sanger⁷⁴ com o auxílio do técnico responsável. As amostras foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante e utilizaram os seguintes primers: *pET Upstream Forward Primer* e *DuetDOWN1 Reverse Primer* para o MCS1 do vetor pETDuet-1, *DuetUP2 Forward Primer* e *T7 Terminator Reverse Primer* para o MCS2 do vetor pETDuet-1 e *SUMO Forward Primer* e *T7 Reverse Primer* para o vetor pET SUMO.

Posteriormente, realizou-se a transformação dos vetores em uma linhagem de expressão *E. coli* Rosetta-DE3 (*Novagen*) através dos mesmos procedimentos já descritos para a linhagem DH5- α . Uma colônia dos transformantes foi inoculada em 10 ml de meio LB contendo os antibióticos de seleção de cada vetor e da própria bactéria (34 µg/ml de cloranfenicol). Depois de 16 h a 37 °C sob uma agitação de 250 rpm, tal pré-inóculo foi diluído (1:100) em 1 l de meio LB contendo os mesmos antibióticos. Ao atingir uma densidade celular correspondente a uma absorbância, monitorada em 600 nm, entre 0.6 a 0.8, diminuiu-se a temperatura para 20 °C e a agitação foi desativada. Após 30 min, a agitação foi reativada e prosseguiu-se com a indução da expressão gênica, por 16h, através da adição de 300 mM isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG).

3.1.2 Purificação de proteínas recombinantes

Decorrido o período de expressão, a suspensão celular foi centrifugada a 6,000×g por 40 min a 4 °C, sendo o sobrenadante descartado e as células ressuspendidas em 40 ml do tampão de purificação (25 mM Hepes pH 7.8, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ e 5% (v/v) glicerol, tampão A). Apesar disso, somente metade desse volume foi de fato usado nas etapas de purificações descritas, os 20 ml restantes foram armazenados a -80 °C e utilizados posteriormente. Quando necessário, prosseguiu-se com o descongelamento em água morna e, em seguida, realizou-se um processo de lise celular constituído por duas etapas. Na primeira, incubou-se a suspensão durante 30 min no gelo na presença de 100 µg/ml de lisozima. A seguir, foi realizada a lise através de um sonicador (*Fisher Scientific - Sonic Dismembrator Model 500*), operando em 25% de amplitude, em intervalos regulares

de 20 s de sonicação e 40 s de repouso durante 18 ciclos, mantendo a suspensão sempre sob um banho de gelo. A fim de separar a fração solúvel da insolúvel, prosseguiu-se com duas centrifugações a $16.000\times g$ por 30 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e uma filtração da fração sobrenadante em um filtro de $0.45\text{ }\mu\text{m}$.

A fração solúvel do lisado foi imediatamente aplicada a 1 ml/min em uma coluna de cromatografia de afinidade ao níquel do tipo *Histrap HP 5 ml* (*GE Healthcare*) previamente equilibrada com o [tampão de purificação](#) e acoplada a um sistema *ÄKTA purifier* (*GE Healthcare*). Após a injeção, realizou-se uma etapa de lavagem a 4 ml/min utilizando 10% (v/v) do tampão de eluição (25 mM Hepes pH 7.8, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 5% (v/v) glicerol e 500 mM imidazol, tampão B) e, em seguida, as proteínas de interesse foram eluídas através de um gradiente linear do mesmo tampão partindo de 10 a 100% (v/v) em 10 min. As frações correspondentes ao pico de eluição foram misturadas e concentradas utilizando um filtro de ultra-centrifugação Amicon de 30 kDa (*Milipore*) a $800\times g$, a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e em intervalos de 5 min realizando sempre a ressuspensão da amostra. Ressalta-se que tal concentrador foi tratado anteriormente com uma solução com 5% (v/v) de *Tween 20* por 1 h a fim de aprimorar a recuperação das amostras.

Visando separar os estado oligoméricos indesejados e principalmente agregados, realizou-se uma segunda etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular. Após centrifugar as amostras a $16,000\times g$ por 5 min a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, realizou-se a injeção de 1 ml, num fluxo de 0.5 ml/min , em uma coluna *Superdex 200 10/300 GL* (*GE Healthcare*) previamente equilibrada com o [tampão de purificação](#) e acoplada a um sistema *ÄKTA purifier* (*GE Healthcare*). Por fim, as frações referentes ao estado oligomérico de interesse provenientes desta cromatografia foram concentradas de acordo com os procedimentos descritos anteriormente. Ressalta-se que a purificação dos dímeros SEPT7G, SEPT7G-3GC, SEPT7G-3GC_{T282Y} e SEPT7G-9GC foi realizada seguindo esse protocolo.

Uma vez que a septina 9 está inserida no vetor pET SUMO, tem-se que o seu protocolo de purificação requer algumas modificações. Primeiramente, realizou-se uma purificação por cromatografia de afinidade ao níquel de forma semelhante ao descrito anteriormente, mudando somente a porcentagem do [tampão de eluição](#) na lavagem para 12%. Com o intuito de retirar todo o imidazol presente no eluato, optou-se por voltar para o [tampão de purificação](#) convencional utilizando uma coluna de dessalinização *HiPrep 26/10 Desalting* (*GE Healthcare*), injetando 10 ml da amostra, sob fluxo de 4 ml/min . Após, com o propósito de clivar a SUMO, incubou-se a amostra com a respectiva protease durante 2 horas, a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob banho de gelo. A seguinte proporção foi usada: 0.2 mg de SUMO protease para cada 10 mg de proteína de fusão. Decorrido o tempo, injetou-se todo o volume na mesma coluna de cromatografia de afinidade ao níquel utilizada (fluxo de 1 ml/min) e, em seguida, realizou-se uma etapa de eluição da proteína clivada (fluxo de 4 ml/min) utilizando 6% (v/v) do [tampão de eluição](#). Por fim, eluiu-se a SUMO através de

um gradiente linear do mesmo tampão partindo de 6 a 50% (v/v) em 5 min. Note que a proteína de interesse foi agora recuperada na etapa de lavagem e não mais na eluição pelo gradiente. Por último, foi realizada uma gel filtração e as amostras foram concentradas de acordo com os protocolos já descritos, purificando a SEPT9GC.

A fim de avaliar a dependência do estado oligomérico com a concentração de sal, foi necessário realizar uma troca de tampão das amostras mudando do tampão a alto sal (25 mM Hepes pH 7.8, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ e 5% (v/v) glicerol) para um a baixo (25 mM Hepes pH 7.8, 40 mM NaCl e 5% (v/v) glicerol). Para isso, obteve-se primeiramente as proteínas no [tampão a alto sal](#) conforme os procedimentos descritos e, em seguida, realizou-se uma dessalinização através de uma coluna *HiTrap Desalting* (GE Healthcare) previamente equilibrada com o [tampão a baixo sal](#) e acoplada a um sistema *ÅKTA purifier* (GE Healthcare), injetando 1 ml a um fluxo de 4 ml/min. Após, incubou-se a amostra nesse novo tampão durante 2 horas, a 10 °C e sob banho de gelo a fim de permitir o estabelecimento do equilíbrio químico. Por fim, realizou-se uma segunda gel filtração de maneira semelhante a primeira, usando, por outro lado, o [tampão a baixo sal](#).

Além da influência da concentração da força iônica, realizou-se também testes para verificar a influência dos nucleotídeos GDP, GTP ou GTPγS no estado oligomérico da SEPT9GC quando inserida em um ambiente com diferentes concentrações de sal. Os processos de purificação utilizados para tal septina, em ambos os casos, foram idênticos aos descritos anteriormente. Na situação com o [tampão a alto sal](#), uma solução de 500 µl, contendo 15 µM de SEPT9GC e 75 µM de cada nucleotídeo foi incubada durante 2 horas, a 10°C e sob banho de gelo e, posteriormente, injetada em uma coluna *Superdex 200 10/300 GL* (GE Healthcare) equilibrada com tal tampão e sob fluxo de 0.5 ml/min. O mesmo procedimento foi repetido no caso do [tampão a baixo sal](#), porém 1 mM de MgCl₂ foi acrescentado na solução.

Tabela 2 – Valores calculados das massas moleculares (MM) e dos coeficientes de extinção molar (ϵ_0) das septinas analisadas considerando diferentes estados oligoméricos.

Construção	Vetor	Estado Oligomérico	MM (g/mol)	ϵ_0 (M ⁻¹ cm ⁻¹)
7G-7G	pETDuet-1	Dímero	65,398.67	48,820
7G-3GC	pETDuet-1	Dímero	66,495.82	51,340
7G-3GC _{T282Y}	pETDuet-1	Dímero	66,557.89	52,830
7G-9GC	pETDuet-1	Dímero	66,376.97	45,840
7G-9GC	pETDuet-1	Tetrâmero	132,735.92	91,680
9GC	pET SUMO	Monômero	33,918.82	21,430

Fonte: Elaborada pelo autor.

A determinação da concentração das proteínas foi realizada a partir da absorbância em 280 nm medida com o equipamento *NanoDrop 100* (Thermo fisher Scientific) e conside-

rando o valor de massa molecular e do coeficiente de extinção molar (ϵ_0) determinados pela ferramenta *ProtParam* do *ExPASy*⁷⁵ como evidenciado na Tabela 2. Além disso, tem-se que todas as amostras obtidas ao longo dos processos de purificação foram analisadas em géis de poliacrilamida 12% (m/v). As amostras purificadas foram preferencialmente utilizadas frescas, mas, em alguns casos, foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C. Nesses casos, antes de serem utilizadas, foram sempre descongeladas em banho de gelo e, após, centrifugadas a 16,000×g por 5 min a 10 °C.

3.2 Caracterização bioquímica

3.2.1 Determinação do teor de nucleotídeo por cromatografia de troca iônica

Utilizando a metodologia descrita por Seckler⁷⁶, determinou-se a presença e a natureza dos nucleotídeos guanina ligados ao domínio GTPase dos dímeros SEPT7G-7G, SEPT7G-3GC, SEPT7G-3GC_{T282Y} e SEPT7G-9GC, do tetrâmero SEPT7G-9GC e do monômero SEPT9GC. Para isso, 500 µl de cada amostra a 1.0 mg/ml foram incubados com 250 µl de 1.5 M de HClO₄ por 10 minutos no gelo para desnaturação das proteínas e consequente liberação dos nucleotídeos quando presentes. As amostras foram centrifugadas a 16,000×g a 4 °C por 10 min e, em seguida, transferiu-se 600 µl da fração solúvel para um novo microtubo em que foram adicionados 100 µl de 1.0 M K₂HPO₄, 100 µl de 3.0 M KOH e 20 µl de 5.0 M ácido acético visando precipitar o sal KClO₄ e neutralizar o pH. Após centrifugar novamente, aplicou-se 150 µl da nova fração solúvel em uma coluna de troca iônica *Protein Pack DEAE-5PW* (*Waters*), previamente equilibrada com tampão A (50 mM Tris-HCl pH 8.0) e acoplada a um cromatógrafo *Alliance 2695* (*Waters*), sob fluxo de 1 ml/min. Para eluir os possíveis nucleotídeos, optou-se pela realização de um gradiente linear de NaCl, partindo de 10 a 45% (v/v) de tampão B (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.0 M NaCl) em 10 min. A coluna foi calibrada com uma solução de 20 µM GDP e GTP submetida aos mesmos tratamentos químicos descritos.

3.2.2 Espalhamento multiangular de luz acoplado a cromatografia de exclusão molecular (SEC-MALS)

Apesar da cromatografia de exclusão molecular possibilitar uma estimativa da massa molecular, a acurácia do resultado é somente satisfatória para proteínas globulares, o que não se aplica no caso dos dímeros e tetrâmeros analisados. Consequentemente, optou-se pela realização do SEC-MALS já que o mesmo não possui tal limitação por utilizar o espalhamento, e não o volume de eluição, para calcular a massa molecular.⁷⁷

O equipamento utilizado consiste de um detector de espalhamento *miniDAWN TREOS* (*Wyatt Technology*) capaz de medir três ângulos (43.6°, 90.0° e 136.4°) e um refratômetro *Optilab T-rEX* (*Wyatt Technology*), sendo ambos acoplados a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) *Waters 600* (*Wyatt Technology*).

Em uma coluna de exclusão molecular *Superdex 200 Increase 10/300 GL* (*GE Healthcare*), injetou-se 50 μ l de cada amostra a 3.0 mg/ml a um fluxo de 0.5 ml/min. No caso dos dímeros SEPT7G-7G, SEPT7G-3GC, SEPT7G-3GC_{T282Y} e SEPT7G-9GC e do monômero SEPT9GC, utilizou-se um tampão composto de 25 mM Hepes pH 7.8, 300 mM NaCl e 5 mM MgCl₂, enquanto que para o do tetrâmero SEPT7G-9GC, o tampão foi 25 mM Hepes pH 7.8 e 40 mM NaCl. A análise dos dados foi realizada no programa *ASTRA* (*Wyatt Technology*).

3.3 Caracterização biofísica

3.3.1 Fluorimetria diferencial de varredura (DSF)

A estabilidade térmica dos dímeros SEPT7G-7G, SEPT7G-3GC, SEPT7G-3GC_{T282Y} e SEPT7G-9GC foi analisada através do monitoramento da fluorescência emitida pelo marcador *SYPRO Orange* em função da temperatura. Uma vez que tal molécula somente fluoresce em ambientes altamente apolares, é possível correlacionar a sua fluorescência com o processo de desnaturação térmica, já que durante o mesmo regiões hidrofóbicas da proteína são expostas ao solvente.⁷⁸

No caso de um processo reversível constituído somente de dois estados, como durante o desenovelamento de determinadas proteínas, modelos termodinâmicos demonstram que a curva obtida no DSF é uma sigmoide.⁷⁹ Além disso, pode-se interpretar o ponto de inflexão dessa curva como a condição em que a concentração de proteínas enoveladas é idêntica ao das desenoveladas, sendo a sua temperatura denominada temperatura de transição (T_m). Consequentemente, utiliza-se o valor do T_m como um indicativo da estabilidade térmica de uma proteína em certa condição experimental. Ressalta-se que apesar do processo de desnaturação de algumas proteínas não ser necessariamente reversível, a condição de equilíbrio termodinâmico ainda possibilita a utilização do T_m na descrição da estabilidade térmica.⁷⁸

A fluorescência de cada amostra, constituída por 4 μ M do respectivo dímero e 10X de *SYPRO Orange* (*Thermo Fisher Scientific*) em um volume de 50 μ l, foi monitorada através do equipamento *CFX96 Real-Time PCR System* (*Bio-Rad*) usando o canal HEX. As soluções foram preparadas em triplicatas, inseridas em uma placa de PCR *Multiplate* (*Thermo Fisher Scientific*) com 96 poços, seladas com o filme *Microseal B* (*Thermo Fisher Scientific*) e, por fim, centrifugadas a 500 $\times$ g por 10 s. Inicialmente, manteve-se as amostras a 10 °C por 5 min e, em seguida, aumentou-se a temperatura até 90 °C em passos de 0.5 °C utilizando um tempo de equilíbrio de 30 s entre cada medida.

3.3.2 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

Todos os experimentos de espalhamento a baixo ângulo foram realizados na linha SAXS1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Campinas, São Paulo) que é

caracterizada por possuir um feixe de comprimento de onda igual 1.5498 Å (8 keV) e um detector *Pilatus 300K* (*Dectris*) que foi posicionado de modo com que o módulo do vetor de espalhamento (q) ficasse no intervalo $0.01 \leq q \leq 0.50 \text{ Å}^{-1}$ durante a coleta. As amostras foram posicionadas no centro do feixe através de um sistema de capilar desenvolvido pelos técnicos da própria linha.

A fim de analisar a estabilidade térmica e temporal dos dímeros SEPT7G-7G, SEPT7G-3GC, SEPT7G-3GC_{T282Y} e SEPT7G-9GC, realizou-se três medidas de espalhamento, em intervalos de 3 min, em cada uma das seguintes temperaturas: 20, 37 e 50 °C. Para cada amostra, utilizou-se um tempo de espera de 60 s e um de exposição de 120 s, medindo-se sempre o respectivo tampão seguido do dímero a 2.5 mg/ml. Devido a utilização do sistema de capilar citado, foi possível utilizar um volume de somente 100 µl em cada medida. Além disso, buscando verificar a existência de possíveis danos causados pela radiação incidente, monitorou-se o espalhamento de cada dímero, em intervalos de 3 min, durante 1 h a 20 °C utilizando os mesmos procedimentos descritos. Esse último procedimento também foi realizado com o tetrâmero da SEPT7G-9GC a 3.0 mg/ml.

A integração, normalização pela intensidade do feixe de luz e subtração do espalhamento de cada amostra pelo respectivo tampão foram feitos utilizando um programa automatizado desenvolvido na linha SAXS1. Através do pacote *ATSAS*,⁸⁰ realizou-se a análise dos dados usando especialmente o programa *GNOM* para o cálculo da distribuição de distâncias $P(r)$ e o *DAMMIN* para a obtenção de um modelo do envelope molecular. Já as estimativas da massa molecular foram determinadas através da ferramenta *SAXSMoW*.⁸¹

3.3.3 Espectroscopia de fluorescência com Tioflavina T (ThT)

A propensão dos dímeros SEPT7G-7G, SEPT7G-3GC, SEPT7G-3GC_{T282Y} e SEPT7G-9GC em formar fibras β -amilóides foi verificada de forma indireta através da molécula Tioflavina T, uma vez que, ao interagir com fitas- β , a mesma passa a emitir uma fluorescência característica, comprovando a existência de tal estrutura.⁸² Para isso, utilizou-se um fluorímetro *K2 (ISS)* ajustado em 450 nm na excitação e 482 nm na emissão, sendo tais feixes de luz colimados por uma fenda de 0.1 cm e 0.05 cm respectivamente. Em uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico, inseriu-se uma solução de 500 µl contendo 5 µM das amostras proteicas junto de 50 µM de ThT e a fluorescência foi monitorada em intervalos de 30 s por 1.5 h. Tal experimento foi realizado nas temperaturas: 20, 37, 42 e 50 °C.

3.4 Caracterização estrutural

3.4.1 Cristalografia de raios-X

Os ensaios de cristalização dos dímeros SEPT7G-7G, SEPT7G-3GC, SEPT7G-3GC_{T282Y} e SEPT7G-9GC foram realizados segundo a técnica de difusão de vapor por

sitting drop de maneira automatizada através de um robô *Crystal Gryphon* (*Art Robbins Instruments*) usando placas *INTELLI-PLATE 96-3 Low Profile* (*Art Robbins Instruments*) e os kits *Morpheus* (*Molecular Dimensions*), *JCSG-plus* (*Molecular Dimensions*) e *BCS Screen* (*Molecular Dimensions*). Além da utilização desses diferentes kits, variou-se também as concentrações e temperaturas de cristalização, o que possibilitou a obtenção de diversos cristais. Em todos os casos, adicionou-se 50 μl da solução de cristalização no reservatório e, no poço, 0.2 μl dessa mesma solução com 0.2 μl da proteína, sendo a placa selada com um filme adesivo *ClearVue Sheets* (*Molecular Dimensions*) e posteriormente mantida a 18 °C.

Após aproximadamente 24 h, os cristais foram capturados da gota de cristalização através de um *MicroLoop* (*MiTeGen*) de tamanho apropriado e, em seguida, crio-resfriados em nitrogênio líquido. Uma vez que todas as condições do kit *Morpheus* (*Molecular Dimensions*) são crio-protegidas, não houve a necessidade de recobrir os cristais com uma solução crio-protetora antes de resfriá-los. Optou-se por um curto tempo de cristalização (tipicamente 24 h), uma vez que, em caso contrário, os cristais acabavam se dissolvendo na solução, um situação frequente com cristais de septinas.

Especialmente pela disponibilidade de um alto fluxo de energia, um detector *PILATUS3 6M* (*Dectris*) e um sistema de micro-foco, optou-se por coletar todos os conjuntos de difração na linha I24 do *Diamond Light Source* (Didcot, Inglaterra). A fim de encontrar a região de máxima difração de cada cristal, realizou-se um processo denominado *grid scan* que consiste em, inicialmente, selecionar uma região retangular que engloba o cristal inteiro e, posteriormente, dividi-la em vários quadrados menores de tamanho idêntico ao do feixe utilizado e, por fim, coletar imagens de difração em cada um desses quadrados dessa grade. No caso, utilizou-se uma baixa transmissão (10%) e um curto período de exposição (0.02 s) a fim de minimizar qualquer possível dano ao cristal. Após, programa de coleta calcula o número de reflexões que satisfazem a condição de Bragg em cada uma dessas regiões e retorna uma imagem que é colorida de acordo com a quantidade dessas reflexões, sendo o vermelho a cor que representa a região com mais reflexões. Deste modo é possível encontrar a região de máxima difração do cristal em um determinado ângulo de coleta. Visando centralizar o feixe nessa região, repetiu-se tal procedimento em um outro ângulo distanciado a 90°, mas, ao invés de selecionar todo o cristal para fazer o reconhecimento, basta-se utilizar apenas uma pequena coluna ao redor da região encontrada anteriormente.

Utilizando um feixe caracterizado por um comprimento de onda de 0.9686 Å, um fluxo de 1.99×10^{12} fótons/s e uma transmissão de 20%, coletou-se 3600 imagens de difração de cada cristal usando um tempo de exposição de 0.010 s e um ângulo de oscilação de 0.10°. Durante todo esse processo, manteve-se o cristal sempre a -173 °C através de um sistema de refrigeração com nitrogênio gasoso. Na coleta do conjunto da estrutura 6N0B, utilizou-se um feixe de 30×30 μm e posicionou-se o detector de modo com que a resolução na sua

borda fosse referente a uma resolução de 1.70 Å, nesse caso, a transmissão foi aumentada para 30%. Já para a coleta do conjunto da estrutura 6N12, afastou-se o detector para uma resolução de resolução de 2.00 Å, mas, manteve-se o tamanho do feixe de 30×30 µm. No caso da SEPT7G-3GC_{T282Y}, devido ao menor tamanho do cristal, optou-se por um feixe de 7×7 µm e um detector a uma distância equivalente a uma resolução de 1.70 Å.

Após, os dados foram indexados, integrados e escalonados através do programa *Xia2*⁸³ e o problema das fases foi resolvido com método da substituição molecular disponibilizado no programa *Phaser*.⁸⁴ Para isso, utilizou-se a estrutura do domínio GTPase da SEPT2 identificada pelo PDB ID 2QNR como modelo para resolver a 6N0B, que posteriormente foi utilizada para resolver a estrutura da 6N12. No caso da SEPT7G-3GC_{T282Y}, tanto a SEPT7G PDB ID 6N0B quanto a SEPT3GC PDB ID 4Z54 foram utilizadas como modelos durante a substituição molecular. Em seguida, ciclos de refinamento e reconstrução dos modelos foram realizados utilizando os programas *Phenix*⁸⁵ e *Coot*⁸⁶ até se obter o modelo final. Durante esse processo, o comportamento dos valores de R e R_{free} foram utilizados juntamente com os parâmetros estereoquímicos calculados pelo programa *MolProbity*⁸⁷ para validar as estruturas.

3.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A propensão da SEPT7G-9GC em alterar o seu estado oligomérico em função da força iônica foi analisada também através do experimento de contrastação negativa (do inglês *Negative Stain*). Todas as imagens foram coletadas no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (Campinas, São Paulo) através de um microscópio eletrônico de transmissão *Talos F200C (FEI)* operando a 200 kV. Para isso, optou-se pela utilização de uma grade composta por uma malha 400 constituída de cobre, tendo um filme de suporte de carbono do tipo *lacey* de um lado e um recobrimento ultrafino de carbono do outro (*TED PELLA, INC.*).

Tais grades foram carregadas negativamente a partir de um *PELCO easiGlowTM Glow Discharge Cleaning System (TED PELLA, INC.)* utilizando uma corrente de plasma de 15 mA. Logo após, depositou-se 3 µl de amostra proteica na grade carregada durante 1 min, retirando, em seguida, todo o solvente a partir de um papel filtro. Para eliminar possíveis impurezas, realizou-se uma lavagem adicionando 3 µl de água e a removendo também com um papel filtro. Por fim, 3 µl de uma solução de acetato de uranila 2% (m/v) foram inseridos durante 30 s e retirados com um papel filtro.

Essencialmente, realizou-se a análise da SEPT7G-9GC em três condições de força iônica. A de maior força iônica consistiu na medida do dímero SEPT7G-9GC a 80 µg/ml no **tampão a alto sal** utilizando o lado da grade com o suporte de carbono. A condição de uma força iônica intermediária foi realizada do mesmo modo só que no tampão a médio sal (25 mM Hepes pH 7.8, 150 mM NaCl, 2.5 mM MgCl₂ e 5% (v/v) glicerol). Por

fim, a condição de menor força iônica foi medida com o tetrâmero SEPT7G-9GC a 160 $\mu\text{g/ml}$ no [tampão a baixo sal](#) utilizando o lado da grade com o recobrimento ultrafino de carbono. Ressalta-se que foram realizadas também medidas a baixo sal nas mesmas condições descritas a alto e médio sal. Entretanto, optou-se por aumentar a concentração da proteína e utilizar o outro lado da grade a fim de se obter uma imagem mais definida dos filamentos observados.

4 DOMÍNIO G DE SEPT7

4.1 Objetivos

A fim de compreender as peculiaridades do processo de dimerização da septina 7, buscou-se realizar uma caracterização biofísica do homodímero SEPT7G-7G através da determinação de sua massa, teor de nucleotídeo e envelope molecular. Além disso, visou-se cristalizar o homodímero na presença e na ausência do cofator magnésio no seu sítio ativo, visando analisar possíveis alterações em sua estrutura. Ressalta-se que grande parte dos resultados descritos nesse capítulo foram recentemente publicados na revista *Journal of Structural Biology*.⁶²

4.2 Resultados e discussão

4.2.1 Cromatografias de afinidade ao níquel e exclusão molecular

Conforme descrito na metodologia, após a expressão heteróloga, a purificação do domínio G da Septina 7 (SEPT7G) foi realizada em duas etapas. A primeira, constituída por uma cromatografia de afinidade ao níquel, foi essencial para isolar a proteína de interesse de todas as outras oriundas da própria *E. coli*. Já a segunda, caracterizada por uma exclusão molecular, tornou-se obrigatória para a remoção de agregados e estados oligoméricos indesejados.

A [Figura 18a](#) evidencia o perfil cromatográfico de afinidade ao níquel juntamente da respectiva análise por SDS-PAGE, possibilitando avaliar a eficiência dessa etapa de purificação. Primeiramente, ressalta-se, que a SEPT7G foi expressa em alta quantidade, sendo a sua banda visualizada próximo a 30 kDa, massa condizente com o esperado (32.7 kDa). Durante a injeção da fração solúvel e na lavagem com 10% do tampão B, não se verificou nenhuma perda considerável da SEPT7G. Esta foi eluída através do aumento linear da concentração de imidazol e com poucos contaminantes ([Figura 18a](#), canaleta 4).

O perfil cromatográfico da exclusão molecular da SEPT7G, obtido logo após da afinidade ao níquel ([Figura 18b](#)), evidencia a existência de um pico de eluição intenso (com o seu máximo localizado próximo a 15.3 ml) e outros picos de intensidade desprezível, como o referente ao agregado (localizado no *void* da coluna). A análise das amostras por SDS-PAGE mostram que esse pico majoritário corresponde a SEPT7G. Além disso, é interessante ressaltar que o máximo de intensidade do pico de eluição da SEPT7G quando medido a 254 nm estava extremamente próximo ao respectivo valor a 280 nm (1.3X menor), sugerindo que a proteína estaria ligada a algum nucleotídeo.

Figura 18 – (a) Cromatografia de afinidade ao níquel da SEPT7G e análise por SDS-PAGE 12% (m/v); M: padrão de massa molecular (kDa), 1: fração solúvel após a lise celular, 2: proteínas não-ligadas à resina, 3: lavagem com 10% de tampão B e 4: eluição. (b) Cromatografia de exclusão molecular da SEPT7G e SDS-PAGE 12% (m/v); M: padrão de massa molecular (kDa) e 1: fração do pico mais intenso (15.3 ml).

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.2 Análise do teor de nucleotídeo

A fim de confirmar a hipótese da presença do nucleotídeo ligado, bem como determinar a sua natureza, realizou-se uma cromatografia de troca iônica do conteúdo liberado em sobrenadante após desnaturação da SEPT7G. Como as septinas possuem um domínio de ligação ao nucleotídeo guanosina, como padrão, injetou-se previamente uma mistura constituída somente por GDP e GTP. Como mostrado na [Figura 19a](#), tem-se que o GDP, por ter apenas dois grupos fosfatos em sua estrutura molecular, elui antes do GTP, que possui três fosfatos, sendo os seus volumes de eluição dados por 5.7 e 6.7 ml respectivamente. Os picos visualizados entre os volumes de eluição de 3 a 4 ml fazem referência a outros compostos químicos utilizados durante a desnaturação proteica e, portanto, presentes no tampão. No experimento utilizando o sobrenadante pós-precipitação da SEPT7G, verificou-se um perfil cromatográfico condizente com a existência de GDP, já que o pico de intensidade predominante eluiu em 5.8 ml ([Figura 19b](#)). Deste modo, foi confirmada a presença de nucleotídeo na SEPT7G, sendo este GDP, o que sugeriu que a proteína estava cataliticamente ativa.

4.2.3 Descrição do estado oligomérico

Uma vez que estimativa da massa molecular por meio da cromatografia de exclusão molecular é satisfatória apenas para proteínas globulares, para maior acurácia, o estado oligomérico da SEPT7G foi determinado por SEC-MALS. Conforme verificado na [Figura 20](#), a SEPT7G eluiu com uma massa de 65.8 ± 0.4 kDa, valor condizente com um dímero. Na verdade, ao comparar tal valor com o calculado através da sequência de aminoácidos da SEPT7G dimérica (dado por 65.4 kDa), verifica-se uma discrepância de apenas 0.6% no seu

Figura 19 – Cromatografia de troca iônica (a) dos nucleotídeos GDP e GTP (padrões) e (b) do conteúdo liberado pelo homodímero SEPT7G-7G.

Fonte: Elaborada pelo autor.

valor. É importante ressaltar a existência de um segundo pico menor, que provavelmente faz referência a um estado monomérico da SEPT7G. Entretanto, devido a sua baixa intensidade, seria muito difícil determinar a sua massa com uma acurácia satisfatória.⁶²

A fim de confirmar a existência do estado homodimérico em solução, realizou-se complementarmente medidas de SAXS buscando determinar a massa e o envelope molecular da SEPT7G. Através das três primeiras curvas experimentais medidas da mesma amostra a 20 °C, foi possível calcular o valor médio da massa molecular (junto do seu desvio padrão) e obter as curvas evidenciadas na Figura 21.

Figura 20 – Perfil cromatográfico obtido no SEC-MALS do homodímero SEPT7G-7G; evidenciando o espalhamento de luz a 90° normalizado (linha vermelha), o índice de refração diferencial normalizado (linha azul) e a massa molecular do pico correspondente (linha preta).

Fonte: Adaptada de BROGNARA.⁶²

Figura 21 – (a) Curva de SAXS seguida do respectivo (b) Kratky *plot* do homodímero SEPT7G-7G.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ao analisar a curva de SAXS, é possível verificar que a amostra analisada não apresenta um efeito significativo de agregação a 20 °C; já que os valores de intensidade, no limite de $q \rightarrow 0$, não possui uma tendência a aumentar. Através do Kratky *plot*, tem-se também que tal septina está enovelada; uma vez que se verifica um perfil de ‘sino’ no intervalo de $0 < q < 0.15 \text{ \AA}^{-1}$. Usualmente, atribui-se o restante desse *plot* a um indicativo de flexibilidade na proteína. Entretanto, nesse caso particular, é difícil ter certeza desse fato devido a alta quantidade de ruídos nessa região. A respeito da massa molecular, o valor determinado foi igual a $56 \pm 2 \text{ kDa}$, possuindo uma discrepância de 15% com aquele estimado a partir da sequência de aminoácidos. Apesar disso, ainda é possível afirmar que a SEPT7G é dimérica em solução.

A Figura 22a evidencia a distribuição de pares de distâncias $P(r)$ calculada a

Figura 22 – (a) Distribuição de pares de distâncias $P(r)$ e (b) envelope molecular do homodímero SEPT7G-7G alinhado com a estrutura da SEPT7G (PDB ID 6N12).

Fonte: Elaborada pelo autor.

partir da curva de SAXS. Note que a distância máxima (D_{max}) encontrada foi de 105 Å, um valor extremamente próximo ao medido nas estruturas cristalográficas de dímeros de septinas que é da ordem de 100 Å. Além disso, é importante ressaltar que o máximo dessa distribuição está a esquerda do ponto $D_{max}/2$, indicando que a partícula espalhadora possui um formato achatado (conforme visualizado posteriormente no envelope molecular). Apesar de algumas porções da estrutura da SEPT7G (PDB ID 6N12) não se encaixarem perfeitamente no envelope (Figura 22b), tem-se que de fato a SEPT7G está dimérica.

Assim sendo, a partir dos dados de SEC-MALS e SAXS, tem-se que a SEPT7G está em um estado dimérico em solução. Entretanto, sabe-se que as septinas podem dimerizar via dois tipo de interfaces: NC e G. Uma vez que a SEPT7G está ligada ao nucleotídeo GDP, supõem-se que a interface de dimerização seja, portanto, a G; exatamente como descrito na literatura.^{88,89}

4.2.4 Cristalização

No presente trabalho, foram obtidos críticos que permitiram a determinação de duas estruturas da SEPT7G complexadas com GDP. A identificada pelo PDB ID 6N0B foi cristalizada a 25.0 mg/ml usando a condição G7 do kit *Morpheus* (*Molecular Dimensions*), que é composta por 100 mM Hepes/MOPS pH 7.5, 20% (v/v) glicerol, 10% (m/v) PEG 4,000 e 20 mM de cada um dos seguintes compostos: formato de sódio, acetato de amônio, citrato trissódico dihidratado, oxalato de sódio e tartarato de sódio e potássio tetrahidratado. Já a outra estrutura, identificada pelo PDB ID 6N12, foi cristalizada de maneira semelhante, porém usando a condição A10 do mesmo kit, composta por 100 mM Tris/Bicina pH 8.5, 20% (v/v) etilenoglicol, 10% (m/v) PEG 8,000, 30 mM $MgCl_2$ e 30 mM $CaCl_2$, e uma solução de SEPT7G a 6.0 mg/ml.⁶²

A partir da Figura 23 é possível visualizar os cristais obtidos nas duas condições

Figura 23 – Cristais da SEPT7G obtidos na condição (a) G7 e (b) A10 do kit *Morpheus* seguidos dos respectivos *grid scans* dos cristais utilizados durante a coleta.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3 – Dados de coleta e estatísticas de refinamento das duas estruturas da SEPT7G. Em parênteses estão os valores referentes a camada de mais alta resolução.

PDB ID	SEPT7G <i>C2</i> 6N0B	SEPT7G <i>P6₁</i> 6N12
Coleta de Dados		
Fonte de Raios-X	<i>Diamond I24</i>	<i>Diamond I24</i>
Detector	<i>Pilatus3 6M</i>	<i>Pilatus3 6M</i>
Cela Unitária a; b; c (Å)	151.48; 68.85; 150.52	82.81; 82.81; 209.02
α ; β ; γ (°)	90.0; 122.8; 90.0	90.0; 90.0; 120.0
Grupo Espacial	<i>C2</i>	<i>P6₁</i>
Resolução (Å)	69.40 - 1.73 (1.77 - 1.73)	69.68 - 2.23 (2.29 - 2.23)
λ (Å)	0.9686	0.9686
Multiplicidade	6.5 (6.4)	20.4 (20.6)
R_{pim} (%)	3.1 (49.1)	4.5 (50.9)
CC (1/2)	0.995 (0.806)	0.994 (0.529)
Completeza (%)	100.0 (100.0)	99.2 (98.6)
Reflexões totais	970,454 (70,482)	798,746 (58,615)
Reflexões únicas	149,125 (10,977)	39,079 (2,845)
I/ σ (I)	11.9 (1.2)	8.6 (1.5)
Parâmetros de Refinamento		
Reflexões usadas no refinamento	146,424	38,991
R (%)	17.40	18.13
R_{free} (%)	20.28	21.64
Número de átomos de proteína	8,054	3,924
Número de átomos de ligantes	112	58
B (Å)	28.89	48.79
<i>Clashscore</i>	1.97	2.29
Erros		
Erro de coordenada (Å)	0.20	0.26
Erro de fase (°)	23.86	25.49
Ramachandran plot		
Regiões favoráveis (%)	97.61	94.12
Regiões permitidas (%)	2.39	5.48
<i>Outliers</i> (%)	0.00	0.41
RMSD para a geometria ideal		
Comprimentos de ligação (Å)	0.008	0.008
Ângulos de ligação (°)	0.961	0.942

Fonte: Adaptada de BROGNARA.⁶²

descritas juntamente de seus respectivos *grid scans*. Além de possuírem uma geometria diferente, os cristais apresentam certas regiões de maior difração, evidenciadas pela cor vermelha no *grid scan*. Devido a isso, o feixe foi sempre focado em tais pontos a fim de se obter os melhores dados de difração possíveis.

De maneira análoga ao descrito na literatura,^{88,89} a SEPT7G inicialmente cristalizou no grupo espacial $P6_1$ com um dímero na unidade assimétrica (PDB ID 6N12). Entretanto, através do aprimoramento dos protocolos de purificação e cristalização, foi possível aprimorar a resolução, passando de 3.3 Å para 2.23 Å. Além disso, foi possível cristalizar a mesma proteína no grupo espacial $C2$ (PDB ID 6N0B) e difratá-la a 1.73 Å (a maior resolução reportada para uma septina atualmente). Nesse caso, verificou-se quatro monômeros na unidade assimétrica, sendo os mesmos pareados de maneira a formar um dímero via interface-G (cadeias A e B) e outro via interface-NC (cadeias C e D). A Tabela 3 mostra os dados de coleta e as estatísticas de refinamento de ambas as estruturas.⁶²

4.2.5 Caracterização estrutural

Conforme o esperado, as estruturas de alta resolução da SEPT7G determinadas são extremamente similares as já descritas anteriormente (resolução de 3.3 Å; PDB IDs 3T5D e 3TW4). A subunidade do grupo espacial $C2$ (PDB ID 6N0B), por exemplo, apresenta uma um RMSD de 0.34 ± 0.03 Å com a 3T5D e 0.64 ± 0.02 Å com a 3TW4. Entretanto, devido a maior resolução, as duas novas estruturas possuem densidades eletrônicas mais definidas nas regiões de *loops* e do nucleotídeo GDP. O *meander*- $\beta_9, \beta_{10}/\beta_7, \beta_8$, por exemplo, agora está completamente visível (Figura 24a). Devido a essa completeza, a estrutura de maior resolução (PDB ID 6N0B) contém cerca de 20 resíduos de aminoácidos adicionais por cadeia quando comparada com a 3T5D e 35 com a 3TW4, sendo o número exato dependente do dímero analisado. Além disso, foi possível modelar uma quantidade significativa de moléculas de águas em ambas as estruturas e observar o ordenamento do *switch I* pela primeira vez. Na verdade, o aprimoramento da resolução possibilitou a descrição do correto posicionamento de diversos resíduos envolvidos na interface-G entre dois monômeros, como será descrito posteriormente. Além disso, foi possível identificar inequivocamente a existência de íon magnésio na estrutura $P6_1$ (PDB ID 6N12) e a sua ausência na estrutura $C2$ (PDB ID 6N0B). O RMSD entre os dímeros das duas novas estruturas foi de 0.284 Å (Figura 24b).⁶²

Em duas das quatro cadeias da 6N0B (B e D) a região do *switch I* está completamente ordenada. É importante ressaltar que a mesma possui uma rede cristalina mais densamente empacotada, contendo somente 57% de solvente comparada com 62% da 6N12. Apesar disso, a mesma região está apenas incompleta em dois resíduos na cadeia B da 6N12. Esse resultado é inesperado considerando *small* GTPases já que o *switch I* é altamente flexível.⁴⁷ Na realidade, é extremamente provável que o ordenamento aqui verificado seja resultado de um contado cristalino. A *Leu*₂₃₆ de uma subunidade vizinha, por exemplo, aparenta estabilizar o *switch I* das cadeias B e D na 6N0B *pocket* ao se posicionar em um *pocket* hidrofóbico localizado entre β_2 e o N-terminal do *switch I*.⁶²

A presença do íon Mg^{2+} foi reportada em todas as estruturas de septinas com-

Figura 24 – (a) Superposição estrutural da SEPT7G de PDB ID 6N12 (em amarelo) com as de PDB IDs 3TW4 (em azul) e 3T5D (em vermelho); tanto o GDP quanto o íon Mg^{2+} foram coloridos em tonalidades mais claras. (b) Superposição dos dímeros de PDB ID 6N12 (em amarelo) com o de PDB ID 6N0B (em laranja) evidenciando a ausência do deslizamento da fita- β_3 (em verde na 6N12 e azul na 6N0B); o GDP e o Mg^{2+} na 6N12 foram coloridos de verde e o GDP na 6N0B de azul.

Fonte: Adaptada de BROGNARA.⁶²

plexadas com GTP (ou análogos) descritas até o momento. Ao contrário, no caso dos complexos com GDP, o Mg^{2+} está presente somente em alguns. Na estrutura $P6_1$ (PDB ID 6N12) as duas subunidades possuem o Mg^{2+} ligado no sítio ativo. Isso é provavelmente devido a composição do tampão de purificação e cristalização, que contem 5 mM e 20 mM $MgCl_2$ respectivamente. É interessante notar que o Mg^{2+} não foi incluído em nenhuma das estruturas de baixa resolução anteriormente descritas. Quando ligado a GDP, tem-se que o Mg^{2+} passa a coordenar uma molécula de água que se posiciona no local esperado para o fosfato- γ do GTP; exatamente como observado na estrutura $P6_1$. Entretanto, quando comparado com outras estruturas de septinas, verifica-se que essa particular esfera de coordenação apresenta algumas peculiaridades. O Mg^{2+} coordena diretamente apenas um único átomo da proteína (Ser_{64} do *P-loop*), sendo os cinco sítios restantes ocupados por um oxigênio do fosfato- β e quatro moléculas de água. O Asp_{113} , cujo homólogo em SEPT2 coordena tal íon via uma molécula de água,⁴² está mais longe e requer uma segunda molécula de água para estabelecer o contato apropriado (Figura 25a). Essas observações sugerem que o íon Mg^{2+} nesse caso está coordenado de uma forma fraca, explicando o motivo do mesmo não ser observado nas estruturas de baixa resolução antigas (PDB IDs 3T5D e 3TW4).⁶²

Além disso, a Thr_{90} (do *switch I*, um resíduo essencial à hidrólise do GTP),⁴² está ausente na esfera de coordenação do Mg^{2+} , sugerindo que a perda do fosfato- γ é suficiente para liberar a Thr_{90} mesmo quando o Mg^{2+} está presente. Devido a esse rearranjo

estrutural, a cadeia principal da *Ser*₇₇ garante a coordenação de uma molécula de água, um contato que existe somente devido a uma interação de hidrogênio estabelecida entre *Tyr*₇₆ e *Asp*₁₁₃ (Figura 25a). Deste modo, a estrutura *P*6₁ pode representar um estado intermediário do processo de hidrólise do GTP, uma vez que o fosfato inorgânico já foi liberado, mas o Mg^{2+} ainda permanece no sítio ativo.⁶²

Apesar do fato do tampão de purificação conter 5 mM $MgCl_2$, a estrutura de maior resolução (PDB ID 6N0B) não possui Mg^{2+} , o que provavelmente é consequência do citrato (20 mM), um agente quelante presente na solução de cristalização. Na ausência do íon Mg^{2+} , a *Ser*₈₄ do *switch I* interage com o fosfato- β . Já a *Ser*₆₄ (do *P-loop*) assume uma nova conformação visando interagir diretamente com os fosfatos- α e - β e uma ponte salina emerge entre a *Arg*₈₆ e o *Asp*₁₁₃. Consequentemente, a *Ser*₇₇ é removida da região de interação (Figura 25b).⁶²

O GDP em ambas as estruturas apresenta todos os contatos canônicos com as septinas; incluindo aqueles feitos através da interface-G, como o da *His*₁₇₀.⁴² O fato mais interessante, verificado em todas as seis subunidades independentes das duas estruturas, é que o *switch II* está completamente ordenado e aparenta fazer parte de um contato crucial na interface-G. Essa região é estabilizada de maneira recíproca entre duas subunidades através de interações de hidrogênio estabelecidas entre a carbonila da *Val*₁₂₁ e a amina da *Asn*₁₂₃ (Figura 26a), formando uma ponte- β antiparalela.⁹⁰ Tal motivo estrutural já foi descrito nos artigos da estrutura da SEPT7⁸⁹ e da SEPT3.⁵¹ No primeiro, mutações nessa região acabaram afetando a estabilidade do dímero, mas a real importância de tal interação não foi completamente descrita (talvez pela limitação da resolução). O *Asp*₁₂₂, que está

Figura 25 – (a) Coordenação do íon Mg^{2+} na SEPT7G *P*6₁ (PDB ID 6N12) e (b) a sua ausência na estrutura *C*2 (PDB ID 6N0B); mapa *omit* em 1.0 σ

Fonte: Adaptada de BROGNARA.⁶²

Fonte: Adaptada de BROGNARA.⁶²

localizado entre os dois resíduos que definem a ponte- β , apresenta ângulos de torção não usuais ($\Phi = -112 \pm 1^\circ$ e $\Psi = 103 \pm 2^\circ$); valores somente permitidos para os resíduos de aspartato e asparagina.⁹¹ Um desses dois resíduos está sempre presente nessa posição em todas as septinas humanas (Figura 26b) e é altamente conservado na família como um todo (*S. cerevisiae*, *D. melanogaster*, *C. elegans* e *S. mansoni* por exemplo); indicando que a ponte- β pode ser característica de septinas. Tal motivo estrutural aparenta ser ainda estabilizado por uma série de interações de hidrogênio, incluindo uma formada a partir da cadeia lateral do *Asp*₁₂₂ e a cadeia principal da *Ser*₁₂₄, um *Asx turn*;⁹² e principalmente pela cadeia lateral da *Asn*₁₂₃ que forma um par de interação com a cadeia principal da *Ala*₁₂₀. Interessantemente, o motivo estrutural como um todo é capaz de resistir a proximidade das cargas negativas de dois aspartatos (*Asp*₁₂₂); um de cada subunidade (cerca de 3.5 Å).⁶²

A rigidez desse contato envolvendo o *switch II* na interface-G aparenta estar relacio-

nado com o fenômeno do deslizamento da fita- β_3 . Em septinas, o mesmo foi primeiramente descrito na septina 10 de *S. mansoni* (*SmSEPT10*),⁶¹ mas foi posteriormente verificado em *SEPT2*.⁴² No caso com GTP, a fita- β_3 está localizada na posição ‘não-deslizada’ em que o seu N-terminal permanece perto da interface-NC (**Figura 11**). Já no caso com GDP, a fita- β_3 é deslocada em dois resíduos na direção da interface-G (posição ‘deslizada’), alterando completamente o padrão de interações de hidrogênio estabelecido com a fita- β_1 .⁴² Esse deslizamento requer que o *loop* do *switch II* (conexão da fita- β_3 com a hélice- α_2) seja capaz de acomodar esses dois resíduos. Além disso, tem-se que tal deslizamento é provavelmente facilitado pela existência da sequência KLKL na fita- β_3 , o que permite a invariância de uma *Leu* na segunda posição.⁶²

Ambas estruturas da *SEPT7G* descritas estão no estado ‘não-deslizado’ apesar da presença de GDP (**Figura 24**). Da mesma maneira, as estruturas da *SEPT3* e *SEPT9* (PDB IDs 4Z51, 4Z54, 5CYO e 5CYP) possuem a fita- β_3 na posição ‘não-deslizada’ independentemente da natureza do nucleotídeo ligado. Entretanto, nesses casos, o íon magnésio está sempre presente, o que poderia impedir o deslizamento devido a interações diretas com o *switch II*. As novas estruturas da *SEPT7G* contrariam tal hipótese, já que não se verifica o deslizamento na estrutura mesmo sem o magnésio (PDB ID 6N0B), indicando que o íon não é o responsável por promover o deslizamento. Assim, surgiram questões de qual seria o motivo de algumas septinas deslizarem a fita- β_3 e se existe alguma relevância fisiológica por trás desse processo.⁶²

A disponibilidade de estruturas em alta resolução juntamente com as já depositadas no PDB permitem uma racionalização do fenômeno do deslizamento da fita- β_3 . As únicas estruturas que apresentam tal fenômeno são também aquelas não que formam a ponte- β antiparalela na interface-G (**Figura 26d**), um motivo estrutural que envolve o *switch II*. Tal região está desordenada nas estruturas da *SmSEPT10* e *SEPT2*, o que permite a acomodação dos dois resíduos no *loop* do *switch II* no estado ligado a GDP. Na verdade, essa desordem provavelmente está relacionada a falta de um resíduo homólogo a *Asn*₁₂₃ nessas septinas, um aminoácido essencial na estabilização da ponte- β . Além disso, o modelo canônico do filamento das septinas de mamíferos^{38,66,67} sugere que a dimerização homotípica das *SmSEPT10* e *SEPT2* via interface-G não seria esperada. As interfaces que são observadas nessas estruturas cristalográficas são, portanto, promíscuas e sem relevância fisiológica. Por outro lado, a interface-G descrita na *SEPT7* é fisiológica, e a rigidez promovida pela ponte- β proíbe a acomodação de dois aminoácidos adicionais no *loop* do *switch II*; travando a estrutura na posição ‘não-deslizada’ independentemente do tipo de nucleotídeo ligado ou da presença de Mg^{2+} .⁶²

Essas observações sugerem que o fenômeno do deslizamento da fita- β_3 em septinas, que foi apenas observado em interfaces não-fisiológicas, não possui uma relevância biológica propriamente dita. Certamente, o mesmo não aparenta ser simplesmente um

meio de comunicação entre as interfaces-G e -NC ao longo do filamento, como especulado anteriormente.⁶¹ Por outro lado, tal fenômeno ainda pode ser importante em auxiliar a montagem correta do filamento, representando um mecanismo para desfavorecer interações não-fisiológicas via interface-G.⁶²

4.3 Conclusão

A partir da análise biofísica da septina 7, conclui-se que a mesma é capaz de homodimerizar *in vitro* via interface-G em concordância com o modelo canônico do filamento. Além disso, através de duas novas estruturas cristalográficas a alta resolução da SEPT7G, verificou-se que o íon Mg^{2+} está coordenado de uma maneira mais fraca (em relação aos padrões já descritos na literatura) e que o contato entre os *switches II* (ponte- β antiparalela) aparenta estar relacionado ao fenômeno de não deslizamento da fita- β_3 . Na verdade, os resultados indicam que o tal fenômeno não seria um mecanismo de comunicação entre as interfaces-NC e -G, conforme proposto anteriormente.⁶¹ Entretanto, o mesmo não deve ser necessariamente desprovido de um significado biológico. Pelo contrário, talvez ele seja usado pelas septinas como um artifício a fim de desestimular interfaces promíscuas.⁶²

5 ESTABILIDADE TÉRMICA DE DÍMEROS

5.1 Objetivos

Com o objetivo de caracterizar a interação da SEPT7G com os parceiros fisiológicos SEPT3GC e SEPT9GC, foi realizado um estudo de termoestabilidade utilizando DSF, SAXS e ThT. Além disso, visando analisar a importância de um resíduo específico no processo de dimerização via interface-G, a cristalização do complexo SEPT7G-3GC_{T282Y} e sua caracterização foram também realizadas.

5.2 Resultados e discussão

5.2.1 Purificação dos complexos diméricos

De maneira análoga a SEPT7G-7G, após a expressão heteróloga e lise celular, como descrito na metodologia, uma etapa de purificação por cromatografia de afinidade ao níquel e outra por exclusão molecular foram realizadas para os complexos SEPT7G-3GC, SEPT7G-3GC_{T282Y} e SEPT7G-9GC.

No que se diz respeito a purificação por afinidade, as proteínas mostraram um perfil cromatográfico extremamente semelhante (Figura 27a, Figura 28a e Figura 29a). Curiosamente a expressão das septinas SEPT3GC, 3GC_{T282Y} e 9GC se mostrou sempre maior do que da SEPT7G, como visto na canaleta 1 dos respectivos SDS-PAGE. Tais

Figura 27 – (a) Cromatografia de afinidade ao níquel da SEPT7G-3GC e análise por SDS-PAGE 12% (m/v); M: padrão de massa molecular (kDa), 1: fração solúvel após a lise celular, 2: proteínas não-ligadas à resina, 3: lavagem com 10% de tampão B e 4: eluição. (b) Cromatografia de exclusão molecular da SEPT7G-3GC e SDS-PAGE 12% (m/v); M: padrão de massa molecular (kDa), 1: fração do pico mais intenso (14.8 ml) e 2: fração referente ao volume de eluição ~16.0 ml.

Fonte: Elaborada pelo autor.

septinas aparecem como uma banda sempre acima da SEPT7G (32.7 kDa), já que as mesmas possuem uma massa maior, dadas por: 33.8 kDa (SEPT3GC e 3GC_{T282Y}) e 33.7 kDa (SEPT9GC). De qualquer modo, esperava-se que todo esse excesso fosse eliminado durante a cromatografia de afinidade ao níquel, uma vez que, por não possuírem a cauda de histidinas, elas não interagiriam com a coluna. Porém, como verificado no SDS-PAGE (Figura 27a, Figura 28a e Figura 29a, canaletas 2), tais proteínas acabaram sendo retidas, o que pode ser explicado pela existência de cerca de seis histidinas na superfície de suas estruturas. Assim, para se obter uma fração equimolar de tais heterodímeros, foi feita uma lavagem com 10% de tampão B eliminando completamente as septinas em excesso, sem remover a SEPT7G (Figura 27a, Figura 28a e Figura 29a, canaletas 3). Por fim, ao realizar o gradiente de imidazol, a SEPT3GC, 3GC_{T282Y} ou 9GC co-eluíram com a SEPT7G de uma maneira equimolar (Figura 27a, Figura 28a e Figura 29a, canaletas 4). Deste modo, comprovou-se a existência de uma interação obrigatória entre a SEPT7G e as septinas SEPT3GC, 3GC_{T282Y} ou 9GC; pois, em caso contrário, as septinas em excesso seriam completamente eluídas na etapa de lavagem (por não possuem caudas de histidinas) e a somente a SEPT7G seria recuperada no gradiente.

O perfil cromatográfico da SEPT7GC-3GC na exclusão molecular destaca a existência de um pico intenso, localizado no volume de eluição 14.8 ml (Figura 27b). Uma vez que em tal pico verifica-se a existência tanto da SEPT7G quanto da 3GC (Figura 27b, canaleta 1), assume-se que o mesmo faça referência a um estado heterodimérico. Na verdade, uma vez que o seu volume de eluição é bastante próximo ao do homodímero da SEPT7G-7G, tem-se que tal suposição é extremamente aceitável. Esta hipótese foi comprovada através da análise por SEC-MALS, sendo que o seu resultado será discutido

Figura 28 – (a) Cromatografia de afinidade ao níquel da SEPT7G-3GC_{T282Y} e análise por SDS-PAGE 12% (m/v); M: padrão de massa molecular (kDa), 1: fração solúvel após a lise celular, 2: proteínas não-ligadas à resina, 3: lavagem com 10% de tampão B e 4: eluição. (b) Cromatografia de exclusão molecular da SEPT7G-3GC_{T282Y} e SDS-PAGE 12% (m/v); M: padrão de massa molecular (kDa) e 1: fração do pico mais intenso (14.6 ml).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 29 – (a) Cromatografia de afinidade ao níquel da SEPT7G-9GC e análise por SDS-PAGE 12% (m/v); M: padrão de massa molecular (kDa), 1: fração solúvel após a lise celular, 2: proteínas não-ligadas à resina, 3: lavagem com 10% de tampão B e 4: eluição. (b) Cromatografia de exclusão molecular da SEPT7G-9GC e SDS-PAGE 12% (m/v); M: padrão de massa molecular (kDa), 1: fração do pico mais intenso (14.6 ml) e 2: fração referente ao volume de eluição ~16.0 ml.

Fonte: Elaborada pelo autor.

posteriormente. Logo após, nota-se a existência de um ‘pico’ (localizado próximo ao volume de 16.0 ml) que provavelmente é referente as SEPT7G e 3GC monoméricas. Devido ao fato da coluna utilizada não possuir a resolução adequada para separá-las em dois picos, tem-se as tais septinas acabam por eluir juntas, como observado no SDS-PAGE (Figura 27b, canaleta 2). Por fim, verificou-se que o máximo de intensidade do pico referente ao dímero quando medido a 254 nm é 1.4X menor do que a 280 nm, indicando a presença de algum nucleotídeo.

Com a mutação T282Y na SEPT3GC, ocorreu uma mudança significativa no perfil cromatográfico da exclusão molecular da SEPT7G-3GC_{T282Y} (Figura 28b). Surpreendentemente, todo o excesso de monômeros verificados no caso da SEPT7G-3GC desapareceu, observando-se um pico de eluição extremamente simétrico para o complexo. Além disso, por possuir um máximo em 14.6 ml, SEPT7G-3GC_{T282Y} apresenta-se como um heterodímero conforme esperado e visualizado no gel (Figura 28b, canaleta 1). Semelhantemente, tem-se que o heterodímero parece estar ligado a algum nucleotídeo, já que o máximo do pico de eluição medido a 254 nm é 1.3X menor do que a 280 nm.

O perfil cromatográfico da exclusão molecular da SEPT7G-9GC foi extremamente semelhante ao da SEPT7G-3GC, sendo a única diferença o volume de eluição do pico mais intenso, agora localizado em 14.6 ml (Figura 29b). Novamente, verificou-se a existência de um ‘pico único’ referente aos monômeros de SEPT7G e 9GC (Figura 29b, canaleta 2). Além disso, a razão da intensidade máxima do pico de eluição do heterodímero medida a 280 nm pela a 245 nm é de 1.3X, indicando mais uma vez a existência de algum nucleotídeo.

5.2.2 Análise do teor de nucleotídeo

Novamente, a fim de determinar a presença e a natureza do nucleotídeo ligado aos heterodímeros SEPT7G-3GC, SEPT7G-3GC_{T282Y} e SEPT7G-9GC, utilizou-se a cromatografia de troca iônica para análise dos nucleotídeos liberados após desnaturação e precipitação das proteínas. Assim como o homodímero SEPT7G-7G, todos os heterodímeros analisados estavam também ligados a GDP, conforme verificado pelos perfis cromatográficos (Figura 30). Portanto, tem-se indiretamente que todas as septinas analisadas estavam cataliticamente ativas.

Figura 30 – Cromatografia de troca iônica do conteúdo liberado pelos heterodímeros (a) SEPT7G-3GC, (b) SEPT7G-3GC_{T282Y} e (c) SEPT7G-9GC, evidenciando a presença de GDP.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma vez que tais experimentos foram realizados com a mesma concentração de proteína, pode-se afirmar que todos os dímeros possuem quantidades equivalentes de nucleotídeo, já que as áreas dos picos de eluição referentes ao GDP são extremamente semelhantes, como evidenciado na Tabela 4.

Tabela 4 – Teor de nucleotídeo verificados nos dímeros SEPT7G-7G, SEPT7G-3GC, SEPT7G-3GC_{T282Y} e SEPT7G-9GC seguidos das áreas dos respectivos picos de eluição medidos a 253 nm.

Dímero	Nucleotídeo	Área (u.a. × ml)
7G-7G	GDP	1,583,763
7G-3GC	GDP	1,494,036
7G-3GC _{T282Y}	GDP	1,546,705
7G-9GC	GDP	1,383,255

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2.3 Descrição do estado oligomérico

Buscando confirmar a existência de heterodímeros como mostrado pela cromatografia de exclusão molecular, realizou-se medidas de SEC-MALS. Como visto na Figura 31,

tem-se que a SEPT7G-3GC elui com uma massa de 63.7 ± 0.7 kDa (4% de discrepância considerando o predito a partir da sequência de aminoácidos), a SEPT7G-3GC_{T282Y} com 68.4 ± 0.9 kDa (3% de discrepância) e, por fim, a SEPT7G-9GC com 68.1 ± 0.6 kDa (3% de discrepância); valores coerentes com um estado dimérico conforme o esperado.

Figura 31 – Perfil cromatográfico dos heterodímeros obtido no SEC-MALS (a) SEPT7G-3GC, (b) SEPT7G-3GC_{T282Y} e (c) SEPT7G-9GC; evidenciando o espalhamento de luz a 90° normalizado (linha vermelha), o índice de refração diferencial normalizado (linha azul) e a massa molecular do pico correspondente (linha preta).

Fonte: Elaborada pelo autor.

No caso da SEPT7G-3GC e da SEPT7G-9GC (Figura 31a e c), apesar do cuidado ao coletar somente a fração correspondente ao máximo do pico referente ao heterodímero durante a purificação anterior na exclusão molecular, nota-se também aqui a existência de estados monoméricos da SEPT3GC, da SEPT9G (segundo pico) e da SEPT7G (terceiro pico). Uma vez que tais estados já foram verificados na exclusão molecular (Figura 27b e Figura 29b), concluiu-se que eles são provavelmente resultados de um possível excesso de tais subunidades, que é somente visualizado com clareza no SEC-MALS. Isto porque a coluna utilizada neste experimento possui maior resolução. Por outro lado, ao observar o perfil da SEPT7G-3GC_{T282Y}, tem-se que os estados monoméricos desaparecem (exatamente como na exclusão molecular), promovendo um pico de eluição extremamente simétrico. Consequentemente, pode-se afirmar que tal mutação de alguma forma possibilitou a estabilização da interação da SEPT7G com a SEPT3GC_{T282Y}, extinguindo qualquer monômero livre em solução.

A fim de confirmar novamente a existência dos estados heterodiméricos, determinou-se a massa e envelope molecular da SEPT7G-3GC, SEPT7G-3GC_{T282Y} e SEPT7G-9GC por SAXS. De maneira análoga a SEPT7G-7G, tais dímeros não apresentam efeitos significativos de agregação a 20 °C e estão enovelados, como mostrado na Figura 32. A massa molecular determinada para a SEPT7G-3GC foi de 63 ± 2 kDa (5% de discrepância), enquanto que a da SEPT7G-3GC_{T282Y} com 66 ± 4 kDa (0.4% de discrepância), ambas condizentes com um estado dimérico esperado. A da SEPT7G-9GC, por outro lado, foi igual

Figura 32 – Curvas de SAXS dos heterodímeros (a) SEPT7G-3GC, (c) SEPT7G-3GC_{T282Y} e (e) SEPT7G-9GC seguidas de seus respectivos Kratky plots (b), (d) e (f).

Fonte: Elaborada pelo autor.

a 55 ± 2 kDa, valor que resulta em uma discrepância de 17% considerando a sequência de aminoácidos; um erro consideravelmente alto (assim como o da SEPT7G-7G). Entretanto, ainda é possível afirmar que a SEPT7G-9GC também é dimérica em solução.

A $P(r)$ dos heterodímeros SEPT7G-3GC, SEPT7G-3GC_{T282Y} e SEPT7G-9GC, ao contrário do homodímero da SEPT7G-7G, apresentaram um D_{max} igual a 110 Å, sendo o aumento de 5 Å justificado possivelmente pela existência do C-terminal nas septinas parceiras (Figura 33). Entretanto, é extremamente difícil afirmar isso com certeza, pois a determinação exata do valor de D_{max} é extremamente complexa principalmente devido a existência de agregados, como observado no caso da SEPT7G-3GC_{T282Y} e SEPT7G-9GC devido a existência de mais de um pico na $P(r)$. De qualquer forma, novamente o

Figura 33 – (a) Distribuição de pares de distâncias $P(r)$ dos heterodímeros (a) SEPT7G-3GC, (c) SEPT7G-3GC_{T282Y} e (d) SEPT7G-9GC e seus respectivos envelopes moleculares (b), (d) e (f). Os envelopes da SEPT7G-3GC e SEPT7G-9GC foram alinhados com a estrutura da SEPT7G (PDB ID 6N12), enquanto que o da SEPT7G-3GC_{T282Y} com a sua própria estrutura.

Fonte: Elaborada pelo autor.

máximo das distribuições está sempre a esquerda do ponto $D_{max}/2$, indicando que tais heterodímeros também são achatados. Os envelopes moleculares obtidos, apesar de não permitirem o perfeito encaixe de algumas porções do heterodímeros, garantem a existência de estados diméricos.

Deste modo, tem-se que, por estarem ligados ao nucleotídeo GDP, os complexos SEPT7G-3GC, SEPT7G-3GC_{T282Y} e SEPT7G-9GC estão em um estado dimérico formado via interface-G em solução (exatamente como o homodímero SEPT7G-7G).

5.2.4 Termoestabilidade dos dímeros

Conforme discutido anteriormente, a septina 7 possui tanto a capacidade de formar um homodímero consigo mesma quanto um heterodímero com a SEPT3GC, SEPT3GC_{T282Y} e SEPT9GC. Deste modo, a fim de avaliar comparativamente essas interações, foram realizadas medidas de DSF a fim de determinar a termoestabilidade de cada par. Uma vez que o estado oligomérico inicial de todas as amostras era sempre de um dímero, as análises quantitativas foram feitas em relação à estabilidade do homodímero SEPT7G-7G.

A Figura 34 mostra os termogramas normalizados (para fim de comparação) dos dímeros SEPT7G-7G, SEPT7G-3GC, SEPT7G-3GC_{T282Y} e SEPT7G-9GC seguidos das respectivas temperaturas de transição (T_m). Em todas as curvas obtidas, nota-se uma diminuição da intensidade de fluorescência do marcador *SPYRO Orange* antes e depois da transição térmica propriamente dita, modificando consideravelmente o perfil sigmoidal esperado. Tal resultado pode ser justificado pela existência de efeitos de agregação e precipitação (especialmente no final) que promovem a liberação do marcador ao solvente e, conseqüentemente, a diminuição da sua fluorescência. Por esses motivos, teve-se que a temperatura de transição foi definida como sendo a temperatura do ponto em que fluorescência normalizada fosse igual a 0.5 (meia altura).

Como mostrado na Tabela 5, verifica-se que a SEPT3GC e SEPT9GC acabam por diminuir a estabilidade de uma maneira bastante semelhante o dímero formado com

Figura 34 – DSF dos dímeros: SEPT7G-7G (linha azul), SEPT7G-3GC (linha amarela), SEPT7G-3GC_{T282Y} (linha verde) e SEPT7G-9GC (linha vermelha).

Fonte: Elaborada pelo autor.

a SEPT7G, uma vez a variação da temperatura de transição das duas em relação ao homodímero SEPT7G-7G é de -5.5 ± 0.3 °C; um resultado esperado já que tais septinas apresentam uma identidade sequencial de 70%. Assim sendo, sugere-se que as interações estabelecidas entre as SEPT3GC e SEPT9GC com a SEPT7G nos heterodímeros sejam mais fracas do que as verificadas entre SEPT7G no homodímero; um resultado que pode estar relacionado com a dinâmica de formação de heterocomplexos. Devido a uma interação mais fraca, tais septinas podem talvez apresentar uma maior flexibilidade na constituição dos heterocomplexos, estando presentes para realizar determinadas funções celulares e ausentes em outras, exatamente como no caso da obrigatoriedade da septina 9 para formação de barreiras de difusão durante os estágios finais da divisão celular.⁶⁷

Tabela 5 – Temperaturas de transição (T_m) dos dímeros SEPT7G-7G, SEPT7G-3GC, SEPT7G-3GC_{T282Y} e SEPT7G-9GC seguidos das respectivas variações em relação ao dímero SEPT7G-7G (ΔT_m^{7G}).

Dímero	T_m (°C)	ΔT_m^{7G} (°C)
7G-7G	40.0 ± 0.2	n/a
7G-3GC	34.5 ± 0.1	-5.5 ± 0.3
7G-3GC _{T282Y}	46.0 ± 0.1	$+6.0 \pm 0.3$
7G-9GC	34.5 ± 0.1	-5.5 ± 0.3

Fonte: Elaborada pelo autor.

O dímero SEPT7G-3GC_{T282Y}, por outro lado, apresenta um comportamento oposto aos da SEPT3GC e da SEPT9GC, já que a SEPT3GC_{T282Y} é responsável por estabilizar o heterodímero com a SEPT7G em $+6.0 \pm 0.3$ °C; um resultado surpreendente ainda mais ao comparar com o heterodímero SEPT7G-3GC onde se verifica uma estabilização de $+11.5 \pm 0.2$ °C. É curioso notar que tal mutação ainda promove uma interação heterodimérica muito mais estável do que a do próprio homodímero SEPT7G-7G.

A fim de averiguar os resultados encontrados por DSF, analisou-se a estabilidade térmica e temporal dos dímeros SEPT7G-7G, SEPT7G-3GC, SEPT7G-3GC_{T282Y} e SEPT7G-9GC por SAXS. Para isso, utilizou-se três curvas de SAXS (juntamente dos respectivos Kratky *plots*) medidas em intervalos de 3 min e em cada uma das seguintes temperaturas: 20, 37 e 50 °C.

No caso do homodímero SEPT7G-7G, verifica-se, a partir da [Figura 35](#), a inexistência de um efeito significativo de agregação e perda de estrutura ao longo do tempo nas temperaturas de 20 e 37 °C. Entretanto, a 50 °C, tem-se que a curva de SAXS tem o seu perfil drasticamente alterado, tornando-se extremamente linear no limite de $q \rightarrow 0$. Tal modificação pode ser explicada devido à agregação da septina analisada em um processo induzido pela temperatura. Além disso, nota-se uma diminuição na intensidade ao longo do tempo, o que pode ser justificado por uma possível precipitação da amostra. O Kratky

plot (Figura 35), apesar de ainda possuir o perfil de ‘sino’, possui uma queda brusca na sua intensidade. Deste modo, ao aquecer o homodímero SEPT7G-7G, verificou-se um processo de agregação e precipitação simultâneos, resultando em uma temperatura de transição esperada entre 37 e 50 °C. Este resultado foi condizente com o T_m de 40.0 ± 0.2 °C determinado por DSF.

Figura 35 – Curvas de SAXS do homodímero SEPT7G-7G nas temperaturas de 20, 37 e 50 °C seguidas de seus respectivos Kratky *plots* (b), (d) e (f). Em cada temperatura, a dependência temporal é indicada pelos pontos vermelhos (3 min), verdes (6 min) e azuis (9 min).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Por outro lado, os heterodímeros SEPT7G-3GC e SEPT7G-9GC já apresentaram um processo de agregação e precipitação logo em 37 °C (Figura 36 e Figura 37). O resultado se assemelha com a SEPT7G-7G, porém a 50 °C. Entretanto, ao aumentar a temperatura para 50 °C, verifica-se que os heterodímeros estão completamente agregados e precipitados. A curva de SAXS não se altera mais ao longo do tempo (permanece praticamente linear) e a curva do Kratky *plot* tem a sua intensidade consideravelmente diminuída. Além disso, nota-se um aumento inesperado no limite de $q \rightarrow 0$ em tal curva, resultado que pode ser justificado pela existência de agregados e, como discutido posteriormente, β -amilóides. De qualquer forma, espera-se que as temperaturas de transição da SEPT7G-3GC e da SEPT7G-9GC estejam próximos a 37 °C; valor condizente com o T_m de 34.5 ± 0.1 °C que foi determinado por DSF.

Figura 36 – Curvas de SAXS do heterodímero SEPT7G-3GC nas temperaturas de 20, 37 e 50 °C seguidas de seus respectivos Kratky *plots* (b), (d) e (f). Em cada temperatura, a dependência temporal é indicada pelos pontos vermelhos (3 min), verdes (6 min) e azuis (9 min).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 37 – Curvas de SAXS do heterodímero SEPT7G-9GC nas temperaturas de 20, 37 e 50 °C seguidas de seus respectivos Kratky *plots* (b), (d) e (f). Em cada temperatura, a dependência temporal é indicada pelos pontos vermelhos (3 min), verdes (6 min) e azuis (9 min).

Fonte: Elaborada pelo autor.

O heterodímero SEPT7G-3GC_{T282Y} é o mais termoestável dentre os analisados neste trabalho, possuindo apenas efeitos sutis de agregação e precipitação na temperatura de 50 °C, como visto na Figura 38. Nessa temperatura, o Kratky *plot* da SEPT7G-3GC_{T282Y} apresenta um perfil de ‘sino’ mais proeminente do que a SEPT7G-7G (mesmo depois de 9 min). Assim sendo, espera-se que a temperatura de transição desse heterodímero mutante esteja entre 37 e 50 °C, sendo mais próximo de 50 °C, devido a sua maior termoestabilidade. Tal resultado foi condizente com o T_m determinado por DSF de 46.0 ± 0.1 °C.

Figura 38 – Curvas de SAXS do heterodímero SEPT7G-3GC_{T282Y} nas temperaturas de 20, 37 e 50 °C seguidas de seus respectivos Kratky *plots* (b), (d) e (f). Em cada temperatura, a dependência temporal é indicada pelos pontos vermelhos (3 min), verdes (6 min) e azuis (9 min).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Devido a existência de possíveis danos causados pela radiação incidente durante as medidas de SAXS, monitorou-se o espalhamento de cada dímero durante 1 h a 20 °C. A partir desses dados, notou-se que tais danos são somente relevantes após cerca 30 min de exposição. Consequentemente, os resultados temporais discutidos (de 3 a 9 min) são somente decorrentes da variação de temperatura.

5.2.5 Formação de agregados proteicos do tipo β -amilóide

Devido ao comportamento inesperado dos Kratky *plots* considerando o elevado espalhamento no limite de $q \rightarrow 0$ em altas temperaturas, medidas da fluorescência do ThT em diversas temperaturas foram realizadas a fim de verificar a propensão dos dímeros em formar fibras β -amilóides, uma situação comum em septinas quando analisadas *in vitro*.^{93,94} A partir da Figura 39, nota-se que o heterodímero SEPT7G-3GC possui um comportamento

extremamente semelhante ao do SEPT7G-9GC, mostrando uma quantidade significativa de estruturas β -amilóides a partir de 37 °C. Por outro lado, o homodímero SEPT7G-7G, por ser mais termoestável do que os anteriores, possui uma menor propensão a formação de β -amilóides, os quais são somente verificados a partir de 42 °C, assim como no caso do heterodímero SEPT7G-3GC_{T282Y}. Apesar disso, o heterodímero mutante aparenta novamente ser mais estável do que o homodímero, uma vez que a inclinação da sua curva referente a 42 °C é menos acentuada; indicando uma formação mais lenta de estruturas β -amilóides. Desta forma, tem-se que os experimentos de fluorescência com ThT são condizentes com os resultados de termoestabilidade obtidos por DSF e SAXS.

Figura 39 – Cinética de fluorescência do ThT dos dímeros SEPT7G-7G (azul), SEPT7G-9GC (vermelho), SEPT7G-3GC (amarelo) e SEPT7G-3GC_{T282Y} (verde) quando monitorada a (a) 20, (b) 37, (c) 42 e (d) 50 °C.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Por ser constituída de diversas camadas de fitas- β localizadas perpendicularmente ao eixo da fibra,⁹⁵ a fibra β -amilóide acaba espalhando consideravelmente a luz no limite de $q \rightarrow 0$, modificando o início do Kratky *plot*, exatamente como verificado nas medidas em alta temperatura. De qualquer forma, não se pode desprezar a existência de agregados amorfs durante o aquecimento das septinas.

5.2.6 Cristalização da SEPT7G-3GC_{T282Y}

Apesar do fato de todos os heterodímeros cristalizarem, os cristais referentes a SEPT7G-3GC e SEPT7G-9GC eram constituídos somente pela SEPT7G. Tal fato sugere que, durante o processo de cristalização, ocorreu uma dissociação dos heterodímeros possibilitando a cristalização independente da SEPT7G. Entretanto, devido a sua maior termoestabilidade, foi possível cristalizar a SEPT7G-3GC_{T282Y} a 23.0 mg/ml. Para isso, utilizou-se a condição G3 do kit *Morpheus* (*Molecular Dimensions*), caracterizada por 100 mM MES/imidazol pH 6.5, 20% (v/v) glicerol, 10% (m/v) PEG 4,000 e 20 mM de cada um dos seguintes: formato de sódio, acetato de amônio, citrato trissódico dihidratado, oxalato de sódio e tartarato de sódio e potássio tetrahidratado.

A análise dos cristais obtidos na condição de cristalização descrita mostrou que eram resultantes de um aglomerado de diversas placas cristalinas ([Figura 40](#)). Deste modo, os cristais foram quebrados e as placas obtidas foram congeladas individualmente. A [Figura 40](#) mostra exatamente o *grid scan* da placa utilizada na coleta dos dados de difração.

Figura 40 – Cristais da SEPT7G-3GC_{T282Y} obtidos na condição G3 do kit *Morpheus* seguido do *grid scan* do cristal utilizado durante a coleta.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A SEPT7G-3GC_{T282Y} cristalizou no grupo *P12₁1* e difratou a uma resolução de 2.75 Å. Na unidade assimétrica, verifica-se dois dímeros formados via interface-NC, sendo um referente a SEPT7G-7G (cadeias A e B) e outro a SEPT3GC_{T282Y}-3GC_{T282Y} (cadeias C e D). Os dados de coleta e as estatísticas de refinamento estão mostrados na [Tabela 6](#).

5.2.7 Caracterização estrutural da SEPT7G-3GC_{T282Y}

Apesar do fato de se observar dois homodímeros formados via interface-NC na unidade assimétrica, ao expandir a rede cristalina é possível identificar um heterodímero formado entre a SEPT7G e a 3GC_{T282Y} ([Figura 41a](#)). Além disso, nota-se a presença de

Tabela 6 – Dados de coleta e estatísticas de refinamento da estrutura da SEPT7G-3GC_{T282Y}. Em parênteses estão os valores referentes a camada de mais alta resolução.

PDB ID	SEPT7G-3GC _{T282Y}
-	-
Coleta de Dados	
Fonte de Raios-X	<i>Diamond I24</i>
Detector	<i>Pilatus3 6M</i>
Cela Unitária a; b; c (Å) α ; β ; γ (°)	61.39; 85.53; 152.05; 90.0; 90.97; 90.0
Grupo Espacial	<i>P12₁1</i>
Resolução (Å)	61.28 - 2.75 (2.87 - 2.75)
λ (Å)	0.9686
Multiplicidade	3.6 (3.6)
R _{pim} (%)	9.8 (54.8)
CC (1/2)	0.988 (0.604)
Completeza (%)	94.8 (96.4)
Reflexões totais	139,027 (17,068)
Reflexões únicas	38,827 (4,789)
I/ σ (I)	5.7 (1.3)
Parâmetros de Refinamento	
Reflexões usadas no refinamento	38,766
R (%)	19.70
R _{free} (%)	25.55
Número de átomos de proteína	8,191
Número de átomos de ligantes	112
B (Å)	45.54
<i>Clashscore</i>	4.81
Erros	
Erro de coordenada (Å)	0.44
Erro de fase (°)	28.52
Ramachandran plot	
Regiões favoráveis (%)	94.86
Regiões permitidas (%)	5.14
<i>Outliers</i> (%)	0.00
RMSD para a geometria ideal	
Comprimentos de ligação (Å)	0.003
Ângulos de ligação (°)	0.559

Fonte: Elaborada pelo autor.

GDP e a ausência do íon magnésio no sítio ativo, o que pode ser explicado pela existência de 20 mM de citrato na solução de cristalização; exatamente como no caso da estrutura C2 da SEPT7G (PDB ID 6N0B).

No que se refere ao posicionamento da fita- β_3 , tem-se que a mesma está na conformação ‘não-deslizada’ tanto na SEPT7G quanto na SEPT3GC_{T282Y}. Resultado que reforça a hipótese que o fenômeno de deslizamento é particular de interfaces não-fisiológicas, uma vez que é esperado uma dimerização via interface-G das septina 7 e 3 no modelo canônico do filamento.^{66,67} Curiosamente, ao analisar a ponte- β antiparalela localizada na região do *switch II*, nota-se que, apesar da diferença de alguns resíduos particulares da septina 3, a ponte- β ainda é estabilizada pelo mesmo padrão de interações de hidrogênio observadas no caso do homodímero SEPT7G-7G (Figura 41b). Conforme esperado, tem-se que a Asn₁₃₄ da SEPT3GC_{T282Y} também apresenta ângulos de torção não usuais ($\Phi = -110 \pm 12^\circ$ e $\Psi = 95 \pm 7^\circ$); justificando a conservação dos resíduos de aspartato e asparagina nessa exata posição em toda família das septinas.

Figura 41 – Estrutura do heterodímero SEPT7G-3GC_{T282Y} evidenciando o não deslizamento da fita- β_3 (colorida em vermelho na SEPT7G e azul na SEPT3GC_{T282Y}). (b) Pareamento estrutural (ponte- β) do *switch II* observado no heterodímero. Tal região está destacada por um círculo em (a). Em ambas, a SEPT7G está sempre em amarelo e a SEPT3GC_{T282Y} em verde.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na cadeia A (SEPT7G) e C (SEPT3GC_{T282Y}), tem-se que a região do *switch I* está completamente ordenada. No caso da SEPT7G, verifica-se até a mesma conformação descrita na estrutura C2 (PDB ID 6N0B); sugerindo que o seu ordenamento também seja resultado de um contato cristalino. Diferentemente, observa-se apenas um único contato realizado por uma interação de hidrogênio estabelecida entre a cadeia lateral do Glu₇₉ da SEPT7G (cadeia A) e a amina da Val₁₁₁ da SEPT3GC_{T282Y} (cadeia B); o que pode ser suficiente para estabilizar o *switch I* da SEPT7G como um todo. Por outro lado, o ordenamento do *switch I* da SEPT3GC_{T282Y} não aparenta ser resultado de um contato cristalino, mesmo estando bem próximo da hélice- α_4 da subunidade vizinha.

Devido a ausência do íon magnésio, verifica-se uma mudança conformacional no *switch I* da SEPT3GC_{T282Y} em relação a estrutura da SEPT3GC ligada a GDP e Mg²⁺ (PDB ID 4Z54). Na última, a presença do cofator faz com que a Thr₁₀₂ permaneça próxima

do sítio ativo para coordená-lo; expondo o restante do *switch I* ao solvente (Figura 42a). Já no caso sem Mg^{2+} , o *switch I* se desloca em direção a uma região mais interna da SEPT3GC_{T282Y}, deslocando tanto a Thr₁₀₂ quanto a Lys₁₀₁ para longe do sítio ativo (Figura 42b). O mesmo ainda é estabilizado por interações de hidrogênio entre Glu₉₇ e Arg₈₈ e entre Asn₉₄ e Ala₉₀; contatos não observados na situação com Mg^{2+} . É importante ressaltar que a maioria das interações realizadas na região do *P-loop* são as mesmas em ambos os casos, diferindo apenas na conformação da Ser₇₅ (que passa a interagir com os fosfatos- α e - β) e da Lys₇₄ (que deixa de interagir com o fosfato- β).

Figura 42 – Conformação adotada pelo *switch I* no caso (a) da SEPT3GC com Mg^{2+} (PDB ID 4Z54) e (b) da SEPT3GC_{T282Y} sem Mg^{2+} . Os resíduos do *P-loop* estão identificados em amarelo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Exatamente como nas outras septinas, tem-se que o anel guanina, tanto na SEPT7G quanto na SEPT3GC_{T282Y}, é estabilizado por diversas interações de hidrogênio (através dos resíduos Asp, Gly e Thr), uma ponte salina (entre Arg e Glu) e um clássico *stacking* (formado com Arg e Lys). Além disso, devido à mutação T282Y na SEPT3GC, recupera-se uma interação direta dessa Tyr₂₈₂ com o anel; similarmente ao observado na estrutura da SEPT7G (Figura 43). No caso da SEPT3GC, tal interação não ocorre devido à existência de uma Thr na posição correspondente.

Deste modo, foi possível confirmar a hipótese de que, ao realizar a mutação T282Y na SEPT3GC, haveria uma estabilização da interface-G por meio de uma interação de hidrogênio entre a Tyr com o anel guanina (de maneira análoga ao verificado nas estruturas da SEPT7 e SEPT2).⁵¹ Além disso, ainda se observa uma nova interação de hidrogênio estabelecida com a carbonila do Asp₁₉₇ da SEPT7G (Figura 43b). De qualquer forma, tem-se que tal mutação favorece a estabilização da interface-G como um todo; justificando a variação de $+11.5 \pm 0.2$ °C no T_m da SEPT7G-3GC_{T282Y} em relação a SEPT7G-3GC.

descrita nos resultados de DSF.

Os experimento de DSF, SAXS e ThT indicam que o heterodímero SEPT7G-3GC_{T282Y} ainda é mais termoestável do que o homodímero SEPT7G-7G. Entretanto, ao comparar a interface-G de ambas as estruturas cristalográficas, não foi verificada nenhuma mudança no padrão de interação entre as subunidades. A única diferença de fato observada diz respeito ao *switch I* da SEPT3GC_{T282Y} que possui uma conformação diferente. Entretanto, devido ao problema de contatos cristalinos, falta de densidade eletrônica em certas estruturas/cadeias, e o fato de que, em solução, assume-se que o heterodímero está ligado a Mg²⁺, tem-se que a análise estrutural por traz da importância desse *switch I* na estabilidade da interface-G torna-se extremamente complexa. Apesar disso, uma vez que tal região é extremamente variável (considerando o seu tamanho e sequência) entre as septinas humanas, é razoável supor que talvez o *switch I* da SEPT3GC_{T282Y} juntamente com a mutação sejam os responsáveis pelo aumento da termoestabilidade em relação a SEPT7G.

Ao analisar a rede cristalina da SEPT7G-3GC_{T282Y}, verifica-se dois tipos de interface-NC: uma aberta (entre SEPT7G) e outra fechada (entre SEPT3GC_{T282Y}), como mostrado na Figura 44. Em ambos os casos, nota-se os dois padrões de interações já descritos na literatura.⁴² Deste modo, tem-se que, mesmo em um estado heterodimérico, a septina 3 ainda forma uma interface-NC fechada.

Figura 43 – Interações estabelecidas na região do anel guanina no caso (a) SEPT7G (PDB ID 6N0B), (b) SEPT7G-3GC_{T282Y} e (c) SEPT3GC (PDB ID 4Z54). No caso dos homodímeros, cada subunidade está colorida em duas diferentes tonalidades (claro e escuro), enquanto que, no heterodímero, a SEPT7G está em amarelo e a SEPT3GC_{T282Y} em verde.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 44 – (a) Rede cristalina do heterodímero SEPT7G-3GC_{T282Y}, evidenciando a interface-NC aberta da SEPT7G (amarelo) e fechada da SEPT3GC_{T282Y} (verde). Padrões de interações verificados na interface-NC da (b) SEPT7G (PDB ID 6N0B) e (c) da SEPT3GC_{T282Y}; cada subunidade está colorida com a mesma cor, mas em tonalidades diferentes para serem distinguidas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3 Conclusão

Através da análise da termoestabilidade dos complexos foi possível investigar a associação da SEPT7G com alguns de seus parceiros fisiológicos. Com relação a SEPT3GC e 9GC, verificou-se que a presença de qualquer uma delas tornam o heterodímero formado com a SEPT7G menos estável quando comparado ao homodímero de SEPT7G. Uma vez que as preparações de heterocomplexos octaméricos frequentemente mostram também a presença de hexâmeros (sendo a diferença entre hexâmeros e octâmero atribuída a presença de uma septina do grupo da SEPT3),⁶⁶ tem-se que esse resultado de menor termoestabilidade pode estar relacionado com uma certa dinâmica de formação de heterocomplexos. Desse modo, tem-se que a suposta interação mais fraca com septina 7 traria talvez maior flexibilidade das septinas 3 e 9 na constituição dos filamentos. A presença da SEPT3GC_{T282Y} no complexo, por outro lado, foi responsável por aumentar a sua termoestabilidade através do estabelecimento de uma interação de hidrogênio da *Tyr* com o anel guanina e com a própria SEPT7G, como observado na sua estrutura cristalográfica. Além disso, a partir de

tal estrutura foi possível reforçar a hipótese que do deslizamento da fita- β seja particular de interações promiscuas, verificar o ordenamento do *switch I* da SEPT3GC_{T282Y} na ausência do Mg²⁺ e constatar que, mesmo em um estado heterodimérico, a septina 3 ainda estabelece uma interface-NC fechada consigo mesma.

6 DEPENDÊNCIA DO ESTADO OLIGOMÉRICO EM FUNÇÃO DA FORÇA IÔNICA

6.1 Objetivos

Buscando subsídios para compreender o mecanismo de polimerização da septinas, a dependência do estado oligomérico do heterodímero SEPT7G-9GC em função da alteração da força iônica foi analisado *in vitro*.

6.2 Resultados e discussão

6.2.1 Caracterização da SEPT9GC

Antes de descrever a influência da força iônica no estado oligomérico do dímero SEPT7G-9GC é conveniente explicar o protocolo de purificação da SEPT9GC sozinha, já que ela será utilizada durante a discussão juntamente do dímero SEPT7G-7G. Como descrito anteriormente, a sequência codificante da SEPT9GC foi inserida no vetor pET SUMO e, conseqüentemente, para a sua purificação, é necessário, além da cromatografia de afinidade ao níquel, uma etapa de clivagem da proteína SUMO, seguida de uma segunda afinidade visando isolar a SEPT9GC.

Primeiramente, a SEPT9GC foi expressa em uma alta quantidade e de forma solúvel (Figura 45c, canaleta 1). Além disso, a figura ainda mostra que durante a lavagem com 12% do tampão B, apenas uma pequena fração da SEPT9GC foi perdida, sendo este

Figura 45 – Purificação por cromatografia de afinidade da SEPT9GC (a) quando fusionada a SUMO e (b) após a clivagem com SUMO protease. (c) Análise da expressão e purificação por SDS-PAGE 12% (m/v); M: padrão de massa molecular (kDa), 1: fração solúvel após a lise celular, 2: proteínas não-ligadas à resina, 3: lavagem com 12% de tampão B, 4: eluição da 1ª afinidade, 5: amostra antes da clivagem, 6: depois da clivagem, 7: ‘lavagem’ com 6% de tampão B e 8: eluição da 2ª afinidade.

Fonte: Elaborada pelo autor.

um procedimento essencial para a eliminação de diversos contaminantes. Por fim, durante a eluição da primeira cromatografia de afinidade ao níquel, verificou-se a recuperação da SEPT9GC fusionada a proteína SUMO, uma vez que a banda correspondente (Figura 45c, canaleta 4) está próximo da banda de 45 kDa do padrão (massa esperada da fusão era de 47.6 kDa).

Em seguida, a fim de remover o imidazol presente no tampão de eluição, realizou-se uma dessalinização retornando ao **tampão de purificação**. Após a dessalinização, a SEPT9GC fusionada a SUMO era uma banda única (Figura 45c, canaleta 5) e, após a clivagem, nota-se a existência de três novas bandas: uma referente à SEPT9GC fusionada (próxima a banda de 45 kDa), outra à SEPT9 clivada (próxima a banda de 30 kDa) e uma terceira referente à SUMO livre (próxima a banda de 20 kDa).

Como explicado anteriormente, a SEPT9GC possui pelo menos 6 histidinas na sua superfície, fato que resulta na sua interação com o níquel (mesmo não possuindo uma cauda de histidinas). Consequentemente, para isolá-la durante a segunda cromatografia de afinidade, utilizou-se uma etapa de ‘lavagem’ com 6% do tampão B. Note pela Figura 45, canaleta 7, que tal procedimento foi bem sucedido, já que se conseguiu recuperar a SEPT9GC isoladamente; sem nenhum contaminante da SUMO livre e da SEPT9GC não clivada, que foram somente eluídas durante o gradiente (canaleta 8).

O perfil cromatográfico da exclusão molecular da SEPT9GC evidencia a existência de um pico de eluição intenso e simétrico (com o seu máximo localizado em 15.7 ml) e outro picos de intensidade desprezível (Figura 46a). Através do SEC-MALS, comprovou-se

Figura 46 – (a) Cromatografia de exclusão molecular da SEPT9GC e análise da eluição por SDS-PAGE 12% (m/v); M: padrão de massa molecular (kDa) e 1: fração do pico mais intenso (15.7 ml). (b) Perfil cromatográfico obtido no SEC-MALS do monômero SEPT9GC; evidenciando o espalhamento de luz a 90° normalizado (linha vermelha), o índice de refração diferencial normalizado (linha azul) e a massa molecular do pico correspondente (linha preta).

Fonte: Elaborada pelo autor.

que tal pico faz referência a um estado monomérico já que a SEPT9GC elui com uma massa de 36.3 ± 0.2 kDa; uma discrepância de 7.0% com o valor calculado a partir da sequência de aminoácidos (Figura 46b).

Diferentemente das proteínas já descritas, o pico de eluição da SEPT9GC na máxima intensidade, quando medido a 254 nm é 2.2X menor do que a 280 nm, sugerindo que tal septina estaria na forma Apo (sem nucleotídeo), o que foi confirmado através da análise do teor de nucleotídeos da amostra (Figura 47).

Figura 47 – Cromatografia de troca iônica do conteúdo liberado pelo monômero SEPT9GC, evidenciando a ausência de nucleotídeos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.2.2 Descrição do estado oligomérico considerando diferentes forças iônicas

Ao purificar a SEPT7G-9GC no **tampão a alto sal** (300 mM NaCl), verificou-se o estabelecimento de um heterodímero provavelmente formado via interface G, já que estava ligado a GDP conforme discutido anteriormente. Porém, ao incubar tal dímero em um **tampão a baixo sal** (40 mM NaCl), nota-se um estado oligomérico de massa maior, como mostrado na Figura 48a (pico com máximo próximo a 12.8 ml).

Ao analisar tal pico por SDS-PAGE (Figura 48, canaleta 1), nota-se duas bandas equimolares correspondentes a SEPT7G (32.7 kDa) e SEPT9GC (33.7 kDa). Portanto, tem-se que tal estado oligomérico só poderia fazer referência a um múltiplo inteiro do heterodímero. Devido ao seu volume de eluição, especulou-se que o mesmo faria referência a um tetrâmero. Este resultado foi posteriormente comprovado através da análise por SEC-MALS. A partir da Figura 48b, nota-se um pico bastante simétrico que faz referência a uma massa de 122.3 ± 0.4 kDa, possuindo, portanto, apenas 8% de discrepância para um tetrâmero de SEPT7G-9GC considerando a sequência de aminoácidos.

Figura 48 – (a) Cromatografia de exclusão molecular da SEPT7G-9GC no tampão com 40 mM (roxo) e 300 mM NaCl (vermelho) juntamente do gel de SDS-PAGE 12% (m/v) referente à primeira situação; M: padrão de massa molecular (kDa), 1: fração do pico mais intenso (12.8 ml), 2: do pico de intensidade intermediária (14.6 ml) e 3: do menor pico (~ 16.0 ml). (b) Perfil cromatográfico obtido no SEC-MALS do tetrâmero SEPT7G-9GC; evidenciando o espalhamento de luz a 90° normalizado (linha vermelha), o índice de refração diferencial normalizado (linha azul) e a massa molecular do pico correspondente (linha preta).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A existência do tetrâmero também foi confirmada por SAXS a partir da determinação da massa e do envelope molecular de maneira análoga ao feito com os dímeros. No que se refere a curva de SAXS (Figura 49), nota-se uma diferença significativa do tetrâmero em relação ao dímero SEPT7G-9GC (especialmente no intervalo $0 < q < 0.1 \text{ \AA}^{-1}$); possuindo agora um perfil muito mais linear. Consequentemente, o valor da massa molecular foi maior do que a do dímero e igual a 123 ± 9 kDa, possuindo 7% de discrepância. Além

Figura 49 – (a) Curva de SAXS seguida do respectivo (b) Kratky plot do tetrâmero SEPT7G-9GC.

Fonte: Elaborada pelo autor.

disso, através do *Kratky plot*, verifica-se que tal complexo está enovelado.

Conforme visualizado na [Figura 50a](#), o D_{max} determinado para o tetrâmero foi de 180 Å, exatamente o valor medido na estrutura cristalográfica para um tetrâmero de septinas (PDB ID 6N12). Fato surpreendente, uma vez que a existência de agregados dificulta a determinação precisa desse valor. Novamente, a distribuição é bem assimétrica e deslocada a esquerda do ponto D_{max} , resultado esperado para partículas alongadas. O envelope molecular, não só comprova isso, mas deixa claro a existência de um tetrâmero de septina ([Figura 50b](#)).

Figura 50 – (a) Distribuição de pares de distâncias $P(r)$ e (b) envelope molecular do tetrâmero SEPT7G-9GC alinhado com a estrutura da SEPT7G (PDB ID 6N12).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma vez que a obtenção do tetrâmero foi feita a partir do dímero SEPT7G-9GC purificado no [tampão a alto sal](#), não era esperado que o teor de nucleotídeo se alterasse. Porém, para averiguar tal hipótese, realizou-se a avaliação do teor de nucleotídeos, utilizando a mesma concentração do dímero, sendo obtido perfil mostrado na [Figura 51b](#). Nesta, verifica-se a existência somente de GDP no tetrâmero, como o esperado. Um pico de eluição muito mais intenso e estreito do que no caso do dímero foi observado ([Figura 30c](#)), porém essa diferença foi provocada pela variação da concentração de sais nos tampões de ambas as amostras. Ao comparar as áreas do pico de eluição do GDP, verifica-se valores extremamente próximos dados por: 1,519,800 u.a.×ml (tetrâmero) e 1,383,255 u.a.×ml (dímero); o que resulta em uma discrepância de 10%. Desse modo, o conteúdo de nucleotídeo de ambas as amostras é o mesmo, indicando que o tetrâmero obtido é constituído por um par de dímeros SEPT7G-9GC, provavelmente unidos através de uma interface-NC. Esse resultado é coerente, já que a interface-NC, por ser estabilizada essencialmente por pontes salinas, é extremamente suscetível a interagir em baixa força iônica; exatamente como sugerido a partir do envelope molecular ([Figura 50b](#)).

Figura 51 – Cromatografia de troca iônica (a) dos nucleotídeos GDP e GTP (padrões) e (b) do conteúdo liberado pelo tetrâmero SEPT7G-9GC.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Existem quatro possibilidades para a formação dos tetrâmeros a partir da junção de dois heterodímeros de SEPT7G-9GC, considerando a sua interface-G fixa na união de SEPT7G e SEPT9GC. Como mostrado na [Figura 52](#), duas dessas opções (c e d) seriam simetricamente equivalentes em solução; expondo duas interfaces-NC diferentes ao solvente (uma interface-NC da SEPT7G e outra da SEPT9GC). Consequentemente, se apenas uma dessas duas fosse responsável pela oligomerização, um filamento (infinito) seria produzido em solução, devido a inexistência uma interface que bloqueasse a oligomerização em ambas as extremidades do tetrâmero. Deste modo, as opções (c) e (d) inviabilizariam a observação de um tetrâmero. Assim, apenas dois modelos, um caracterizado pela septina 7 na extremidade (opção a) e outro com a 9 (opção b) são considerados possíveis. Interessantemente, tais estados são exatamente os verificados na rede cristalina da SEPT7G-3GC_{T282Y} ([Figura 44a](#)), fato que reforça a hipótese apresentada.

Figura 52 – Representação esquemática das possíveis organizações do tetrâmero SEPT7G-9GC.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Buscando analisar a suscetibilidade das interfaces-NC do dímero SEPT7G e do monômero SEPT9GC, realizou-se uma cromatografia de exclusão molecular dos mesmos no **tampão a baixo sal** como mostrado na [Figura 53](#). Caso as interfaces-NC da SEPT7G interagissem entre si, esperaria-se um deslocamento do homodímero para um filamento, uma vez que tal interface-NC sempre estaria exposta ao solvente permitindo a polimerização. Por outro lado, caso as interfaces-NC da SEPT9GC interagissem, o monômero se deslocaria para um dímero formado exatamente via interface-NC e expondo duas interfaces-G ao solvente. Entretanto, em ambos os casos, não se verificou nenhuma modificação do estado oligomérico, sugerindo que nenhuma das interfaces-NC são responsáveis pela oligomerização.

Figura 53 – Cromatografia de exclusão molecular da (a) SEPT7G no tampão com 300 mM (azul escuro) e 40 mM NaCl (azul claro) e da (b) SEPT9GC no tampão com 300 mM (vermelho) e 40 mM NaCl (amarelo).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Já que o tetrâmero SEPT7G-9GC foi obtido a partir de um dímero, talvez o resultado da interface-NC da SEPT9GC não permitir uma oligomerização esteja sendo analisado de uma maneira muito simplista. Talvez seja necessário a existência de um núcleo base (supostamente um dímero) para que a interface-NC da SEPT9GC seja capaz de interagir consigo mesma. Tal hipótese é bastante coerente, já que, por tal septina estar monomérica e apo, espera-se que a mesma não seja capaz de interagir nem mesmo via interface-G

Para avaliar tal hipótese, buscou-se dimerizar a SEPT9GC via interface-G a fim de criar um núcleo base homodimérico e, após, verificar o seu comportamento em um tampão a baixa força iônica. Entretanto, tal septina não modifica o seu estado oligomérico independentemente do tipo de nucleotídeo guanina adicionado (GDP, GTP e GTP γ S) ou da concentração de sal, como visto na [Figura 54](#). Note que os nucleotídeos saem quase no volume final da coluna, indicando que talvez os mesmos nem sequer tenham interagido com a SEPT9GC nas condições avaliadas. Neste cenário, parece que a interação de SEPT9GC com SEPT7G via interface-G deve preceder a interação via interface-NC.

Figura 54 – Cromatografia de exclusão molecular da SEPT9GC no tampão com (a) 300 mM (vermelho) e 40 mM NaCl (amarelo). Além disso, em cada caso, incubou-se com 5X de GDP (azul), GTP (verde) e GTP γ S (vermelho).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Assim sendo, especula-se que além da necessidade de um núcleo base dimérico para a se verificar uma modificação do estado de um dímero para um tetrâmero de SEPT7G-9GC, tem-se a necessidade de um pareamento correto entre as septinas, uma situação exclusiva do heterodímero. Consequentemente, a única maneira de se determinar experimentalmente a ordem correta do tetrâmero seria realizando a marcação de uma das septinas com algum anticorpo ou proteína auxiliar (como a MBP), assim como feito para o hexâmero.^{38,68} Para isso, optou-se pela realização do experimento de contrastação negativa (do inglês *Negative Stain*) do tetrâmero.

6.2.3 Filamentos constituídos de SEPT7G-9GC

Ao realizar a medida do tetrâmero SEPT7G-9GC no **tampão a baixo sal**, verificou-se a formação de filamentos com mais de 3 μ m de comprimento, como mostrado na **Figura 55**. Tal resultado é mais um indício que as septinas não precisam obrigatoriamente do N- e C-terminal para polimerizarem; exatamente como no caso de *C. reinhardtii*.⁷ Interessantemente, a sua espessura é dada por 14.0 ± 0.5 nm, sugerindo a existência de duas septinas ao longo do eixo perpendicular ao filamento; uma vez que o valor esperado para a espessura a partir das estruturas cristalográficas é de 6 nm. Para explicar tal medida, pode-se pensar no pareamento de dois filamentos de 6 nm de espessura, sendo o desvio de 2 nm do valor experimental resultado de um aparente alargamento, induzido pelo contraste do acetato de uranila.

De qualquer forma, a visualização de filamento não era esperada, uma vez que, de acordo com todas as técnicas biofísicas utilizadas, tinha-se nitidamente um tetrâmero em solução. Consequentemente, é lógico supor que durante o preparo das grades algum procedimento promoveu a polimerização. Uma vez que a interface-NC das septinas possui

Figura 55 – (a) Micrografia eletrônica do filamento de SEPT7G-9GC. (b) Detalhes da região identificada por um quadrado em (a), destacando a espessura do filamento. Barras de escalas equivalentes a 500 e 100 nm respectivamente.

Fonte: Elaborada pelo autor.

diversos resíduos de aminoácidos carregados (Figura 12), é extremamente razoável supor que, durante a deposição da amostra na grade carregada, o campo elétrico (da própria grade) pode ter induzido a associação dos tetrâmeros em filamentos. A fim de verificar tal hipótese, realizou-se a medida das SEPT7G-9GC em diferentes forças iônicas ([tampão a alto sal](#) e [médio sal](#)) de modo a compensar o efeito desse campo elétrico e possivelmente visualizar o tetrâmero.

Conforme mostrado na Figura 56, nota-se que ao diminuir a força iônica do tampão, a SEPT7G-9GC passa a alterar o seu estado oligomérico até finalmente polimerizar. No [tampão a alto sal](#) (300 mM NaCl), verifica-se apenas alguns contaminantes na grade e nenhum heterodímero; um resultado esperado já que tal molécula por ser extremamente pequena é incapaz de gerar um contraste significativo. Por outro lado, no [tampão a médio sal](#) (150 mM NaCl), nota-se claramente estruturas de tamanho intermediário que possivelmente fazem referência ao tetrâmero ou até estados oligoméricos maiores. Infelizmente, o processo de medida do comprimento de tais estruturas é extremamente complexo e impreciso devido ao baixo contraste da imagem. Por fim, no [tampão a baixo sal](#) (40 mM NaCl), recupera-se os filamentos descritos anteriormente. Desta forma, tem-se que a hipótese do campo elétrico da grade induzir a polimerização do tetrâmero é extremamente plausível, já que ao aumentar a força iônica (e, conseqüentemente, a blindagem eletrostática das proteínas), estados oligoméricos menores são verificados.

Figura 56 – Micrografia eletrônica da SEPT7G-9GC no tampão com (a) 300 mM, (b) 150 mM e (c) 40 mM de NaCl. Barras de escalas equivalentes a 200 nm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma vez que a nítida visualização do tetrâmero não foi possível, qualquer tentativa de marcação de alguma das septinas, visando determinar a ordem do tetrâmero, tornou-se inviável. Apesar disso, especula-se que talvez a septina 9 ocupe a posição central do tetrâmero, como na opção (a) da [Figura 52](#). Resultados recentes do octâmero 2-6-7-9, indicam que a septina 9 somente interage consigo mesmo via interface-NC.⁶⁹ Assim, ao diminuir a força iônica, teria-se que o heterodímero SEPT7G-9GC se associaria em um tetrâmero através de uma interação homotípica estabelecida entre as septinas 9, resultando em uma sequência do tipo: 7-9-9-7.

6.3 Conclusão

Ao incubar o heterodímero SEPT7G-9GC em um tampão de menor força iônica, notou-se a formação de um tetrâmero através de um pareamento de dois dímeros via interface-NC. Além disso, verificou-se que tal contato é exclusivo do estado heterodimérico, sugerindo a existência de processo cooperativo entre as septinas 7 e 9 para a formação do tetrâmero. Devido a inconsistências dos resultados biofísicos, não foi possível identificar qual interface-NC seria a responsável por essa oligomerização. De qualquer forma, especula-se que a septina 9 ocupe a posição central de maneira semelhante ao modelo canônico do octâmero. Por fim, na tentativa de visualizar o tetrâmero através de contrastação negativa para uma futura identificação da sua ordem, observou-se a formação de filamentos em um processo induzido por campo elétrico.

REFERÊNCIAS

- 1 HARTWELL, L. Genetic control of the cell division cycle in yeast: iv. genes controlling bud emergence and cytokinesis. **Experimental Cell Research**, v. 69, n. 2, p. 265 – 276, 1971.
- 2 BYERS, B.; GOETSCH, L. A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. **Journal of Cell Biology**, v. 69, n. 3, p. 717–721, 1976.
- 3 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.
- 4 KIM, H. B.; HAARER, B. K.; PRINGLE, J. R. Cellular morphogenesis in the *saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of the cdc3 gene product and the timing of events at the budding site. **Journal of Cell Biology**, v. 112, n. 4, p. 535–544, 1991.
- 5 FORD, S. K.; PRINGLE, J. R. Cellular morphogenesis in the *saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of the cdc11 gene product and the timing of events at the budding site. **Developmental Genetics**, v. 12, n. 4, p. 281–292, 1991.
- 6 ZERAIK, A. E. et al. Septins of platyhelminths: identification, phylogeny, expression and localization among developmental stages of *schistosoma mansoni*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 12, p. 1–14, 12 2013.
- 7 PINTO, A. P. A. et al. Filaments and fingers: novel structural aspects of the single septin from *chlamydomonas reinhardtii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 26, p. 10899–10911, 2017.
- 8 NEUFELD, T. P.; RUBIN, G. M. The *drosophila* peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins. **Cell**, v. 77, n. 3, p. 371 – 379, 1994.
- 9 HALL, P. A.; JUNG, K.; HILLAN, K. J.; RUSSELL, S. H. Expression profiling the human septin gene family. **Journal of Pathology**, v. 206, n. 3, p. 269–278, 2005.
- 10 NISHIHAMA, R.; ONISHI, M.; PRINGLE, J. R. New insights into the phylogenetic distribution and evolutionary origins of the septins. **Biological Chemistry**, v. 392, p. 681–687, 2011.
- 11 KUSCH, J.; MEYER, A.; SNYDER, M. P.; BARRAL, Y. Microtubule capture by the cleavage apparatus is required for proper spindle positioning in yeast. **Genes & Development**, v. 16, n. 13, p. 1627–1639, 2002.
- 12 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.
- 13 DENT, J. et al. A prototypic platelet septin and its participation in secretion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 5, p. 3064–3069, 2002.
- 14 KIM, S. K. et al. Planar cell polarity acts through septins to control collective cell movement and ciliogenesis. **Science**, v. 329, n. 5997, p. 1337–1340, 2010.

- 15 JOO, E.; SURKA, M. C.; TRIMBLE, W. S. Mammalian sept2 is required for scaffolding nonmuscle myosin ii and its kinases. **Developmental Cell**, v. 13, n. 5, p. 677 – 690, 2007.
- 16 NAGATA, K. et al. 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.
- 17 HU, Q. et al. A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. **Science**, v. 329, n. 5990, p. 436–439, 2010.
- 18 MOSTOWY, S.; COSSART, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, p. 183–194, 2012.
- 19 RUSSELL, S. H.; HALL, P. A. Septin genomics: a road less travelled. **Biological Chemistry**, v. 392, p. 763–767, 2011.
- 20 MACARA, I. G. et al. Mammalian septins nomenclature. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. 12, p. 4111–4113, 2002.
- 21 SELLIN, M. E.; STENMARK, S.; GULLBERG, M. Mammalian sept9 isoforms direct microtubule-dependent arrangements of septin core heteromers. **Molecular Biology of the Cell**, v. 23, n. 21, p. 4242–4255, 2012.
- 22 KINOSHITA, M. Assembly of mammalian septins. **Journal of Biochemistry**, v. 134, n. 4, p. 491–496, 2003.
- 23 DOLAT, L.; HU, Q.; SPILIOTIS, E. T. Septin functions in organ system physiology and pathology. **Biological Chemistry**, v. 395, n. 2, p. 123–141, 2014.
- 24 TSANG, C. W. et al. Superfluous role of mammalian septins 3 and 5 in neuronal development and synaptic transmission. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 23, p. 7012–7029, 2008.
- 25 CAO, L. et al. Phylogenetic and evolutionary analysis of the septin protein family in metazoan. **FEBS Letters**, v. 581, n. 28, p. 5526–5532, 2007.
- 26 LARISCH, S. et al. A novel mitochondrial septin-like protein, arts, mediates apoptosis dependent on its p-loop motif. **Nature Cell Biology**, v. 2, p. 915–921, 2000.
- 27 GOTTFRIED, Y. et al. The mitochondrial arts protein promotes apoptosis through targeting xiap. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 7, p. 1627–1635, 2004.
- 28 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.
- 29 KINOSHITA, N. et al. Mammalian septin sept2 modulates the activity of glast, a glutamate transporter in astrocytes. **Genes to Cells**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2004.
- 30 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.

- 31 ZHANG, Y. et al. Parkin functions as an e2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, cdcel-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 24, p. 13354–13359, 2000.
- 32 KINOSHITA, A. et al. Identification of septins in neurofibrillary tangles in alzheimer's disease. **American Journal of Pathology**, v. 153, n. 5, p. 1551–1560, 1998.
- 33 LEIPE, D. D.; WOLF, Y. I.; KOONIN, E. V.; ARAVIND, L. Classification and evolution of p-loop gtpases and related atpases11edited by j. thornton. **Journal of Molecular Biology**, v. 317, n. 1, p. 41 – 72, 2002.
- 34 BOURNE, H. R.; SANDERS, D. A.; MCCORMICK, F. The gtpase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. **Nature**, v. 349, p. 117 – 127, 1991.
- 35 WENNERBERG, K.; ROSSMAN, K. L.; DER, C. J. The ras superfamily at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 5, p. 843–846, 2005.
- 36 KINOSHITA, M. et al. Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. **Genes & Development**, v. 11, n. 12, p. 1535–1547, 1997.
- 37 PAN, F.; MALMBERG, R. L.; MOMANY, M. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 103, p. 1 – 17, 2007.
- 38 SIRAJUDDIN, M. et al. Structural insight into filament formation by mammalian septins. **Nature**, v. 449, p. 311–315, 2007.
- 39 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.
- 40 ZHANG, J. et al. Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin h5 is modulated by gtp. **Current Biology**, v. 9, n. 24, p. 1458 – 1467, 1999.
- 41 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**, v. 106, n. 39, p. 16592–16597, 2009.
- 42 VALADARES, N. F.; PEREIRA, H. d' M.; ARAUJO, A. P. U.; GARRATT, R. C. Septin structure and filament assembly. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 5, p. 481–500, 2017.
- 43 KEEFE, L. J.; SONDEK, J.; SHORTLE, D.; LATTMAN, E. E. The alpha aneurism: a structural motif revealed in an insertion mutant of staphylococcal nuclease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 8, p. 3275–3279, 1993.
- 44 WEIRICH, C. S.; ERZBERGER, J. P.; BARRAL, Y. The septin family of gtpases: architecture and dynamics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 478–489, 2008.

- 45 SPRANG, S. R. Invited review: activation of g proteins by gtp and the mechanism of $\text{g}\alpha$ -catalyzed gtp hydrolysis. **Biopolymers**, v. 105, n. 8, p. 449–462, 2016.
- 46 HALLS, M. L.; COOPER, D. M. Regulation by Ca^{2+} -signaling pathways of adenylyl cyclases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 1, 2011.
- 47 VETTER, I. R.; WITTINGHOFER, A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. **Science**, v. 294, n. 5545, p. 1299–1304, 2001.
- 48 WITTINGHOFER, A.; VETTER, I. R. Structure-function relationships of the g domain, a canonical switch motif. **Annual Review of Biochemistry**, v. 80, n. 1, p. 943–971, 2011.
- 49 ZENT, E.; WITTINGHOFER, A. Human septin isoforms and the gdp-gtp cycle. **Biological Chemistry**, v. 395, n. 2, p. 169–180, 2014.
- 50 GASPER, R. et al. It takes two to tango: regulation of g proteins by dimerization. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, p. 423–429, 2009.
- 51 MACEDO, J. N. A. et al. 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.
- 52 DESAI, A.; MITCHISON, T. J. Microtubule polymerization dynamics. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 13, n. 1, p. 83–117, 1997.
- 53 HUANG, Y.-W. et al. Gtp binding and hydrolysis kinetics of human septin 2. **The FEBS Journal**, v. 273, n. 14, p. 3248–3260, 2006.
- 54 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.
- 55 MITCHISON, T. J.; FIELD, C. M. Cytoskeleton: what does gtp do for septins? **Current Biology**, v. 12, n. 22, p. R788 – R790, 2002.
- 56 VRABIOIU, A. M. et al. The majority of the *saccharomyces cerevisiae* septin complexes do not exchange guanine nucleotides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 4, p. 3111–3118, 2004.
- 57 FIELD, C. M. et al. A purified drosophila septin complex forms filaments and exhibits gtpase activity. **Journal of Cell Biology**, v. 133, n. 3, p. 605–616, 1996.
- 58 KINOSHITA, M. et al. Self- and actin-templated assembly of mammalian septins. **Developmental Cell**, v. 3, n. 6, p. 791 – 802, 2002.
- 59 VERSELE, M.; THORNER, J. Septin collar formation in budding yeast requires gtp binding and direct phosphorylation by the pak, cla4. **Journal of Cell Biology**, v. 164, n. 5, p. 701–715, 2004.
- 60 ZHANG, J. et al. Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin h5 is modulated by gtp. **Current Biology**, v. 9, n. 24, p. 1458 – 1467, 1999.
- 61 ZERAIK, A. E. et al. 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.

- 62 BROGNARA, G. et al. Revisiting sept7 and the slippage of β -strands in the septin family. **Journal of Structural Biology**, v. 207, n. 1, p. 67 – 73, 2019.
- 63 GOLDBERG, J. Structural basis for activation of arf gtpase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and gtp–myristoyl switching. **Cell**, v. 95, n. 2, p. 237–248, 1998.
- 64 SHEFFIELD, P. J. et al. Borg/septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 5, p. 3483–3488, 2003.
- 65 LOW, C.; MACARA, I. G. Structural analysis of septin 2, 6, and 7 complexes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 41, p. 30697–30706, 2006.
- 66 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.
- 67 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. **Journal of Cell Biology**, v. 195, n. 5, p. 815–826, 2011.
- 68 MENDONÇA, D. C. et al. **Repositioning septins within the core particle**. 2019. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2019/03/08/569251.full.pdf>>. Acesso em: 30 abr. 2019.
- 69 SOROOR, F. et al. **Revised subunit order of mammalian septin complexes explains their in vitro polymerization properties**. 2019. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2019/03/07/569871.full.pdf>>. Acesso em: 30 abr. 2019.
- 70 SANDROCK, K. et al. Characterization of human septin interactions. **Biological Chemistry**, v. 392, p. 751–761, 2011.
- 71 NAKAHIRA, M. et al. A draft of the human septin interactome. **PLOS ONE**, v. 5, n. 11, p. 1–12, 11 2010.
- 72 ESTEY, M. P.; KIM, M. S.; TRIMBLE, W. S. Septins. **Current Biology**, v. 10, p. R384–R387, 2011.
- 73 JOBERTY, G. et al. Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by cdc42. **Nature Cell Biology**, v. 3, p. 861–866, 2001.
- 74 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.
- 75 ARTIMO, P. et al. Expasy: Sib bioinformatics resource portal. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. W1, p. W597–W603, 2012.
- 76 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.

- 77 FOLTA-STOGNIEW, E.; WILLIAMS, K. R. Determination of molecular masses of proteins in solution: implementation of an hplc size exclusion chromatography and laser light scattering service in a core laboratory. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 10, n. 2, p. 51–63, 1999.
- 78 NIESEN, F. H.; BERGLUND, H.; VEDADI, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2212 – 2221, 2007.
- 79 WRIGHT, T. A.; STEWART, J. M.; PAGE, R. C.; KONKOLEWICZ, D. Extraction of thermodynamic parameters of protein unfolding using parallelized differential scanning fluorimetry. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 8, n. 3, p. 553–558, 2017.
- 80 PETOUKHOV, M. V. et al. New developments in the atsas program package for small-angle scattering data analysis. **Journal of Applied Crystallography**, v. 45, n. 2, p. 342–350, 2012.
- 81 PIIADOV, V. et al. Saxsmow 2.0: online calculator of the molecular weight of proteins in dilute solution from experimental saxs data measured on a relative scale. **Protein Science**, v. 28, n. 2, p. 454–463, 2019.
- 82 KREBS, M.; BROMLEY, E.; DONALD, A. The binding of thioflavin-t to amyloid fibrils: localisation and implications. **Journal of Structural Biology**, v. 149, n. 1, p. 30 – 37, 2005.
- 83 WINTER, G.; LOBLEY, C. M. C.; PRINCE, S. M. Decision making in xia2. **Acta Crystallographica Section D**, v. 69, n. 7, p. 1260–1273, 2013.
- 84 MCCOY, A. J. Solving structures of protein complexes by molecular replacement with phaser. **Acta Crystallographica Section D**, v. 63, n. 1, p. 32–41, 2007.
- 85 ADAMS, P. D. et al. Phenix: building new software for automated crystallographic structure determination. **Acta Crystallographica Section D**, v. 58, n. 11, p. 1948–1954, 2002.
- 86 EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D**, v. 60, n. 12 Part 1, p. 2126–2132, 2004.
- 87 CHEN, V. B. et al. Molprobity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D**, v. 66, n. 1, p. 12–21, Jan 2010.
- 88 SERRAO, V. H. B. et al. Promiscuous interactions of human septins: the gtp binding domain of sept7 forms filaments within the crystal. **FEBS Letters**, v. 585, n. 24, p. 3868–3873, 2011.
- 89 ELDAR, V. I. Z.; ALFRED, W. Structural and biochemical properties of sept7, a unique septin required for filament formation. **Biological Chemistry**, v. 392, p. 791–797, 2011.
- 90 KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. **Biopolymers**, v. 22, n. 12, p. 2577–2637, 1983.

-
- 91 HOVMÖLLER, S.; ZHOU, T.; OHLSON, T. Conformations of amino acids in proteins. **Acta Crystallographica Section D**, v. 58, n. 5, p. 768–776, 2002.
- 92 RICHARDSON, J. S. The anatomy and taxonomy of protein structure. **Advances in Protein Chemistry**, v. 34, p. 167 – 339, 1981.
- 93 GARCIA, W. et al. 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.
- 94 DAMALIO, J. C. P. et al. Self assembly of human septin 2 into amyloid filaments. **Biochimie**, v. 94, n. 3, p. 628 – 636.
- 95 CHITI, F.; DOBSON, C. M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. **Annual Review of Biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 333–366, 2006.