Universidade de São Paulo

Instituto de Física de São Carlos (IFSC)

Departamento de Física e Informática (FFI)

Estudos Estruturais e Bioquímicos das Septinas Humanas

Bradeiona α e β

Wânius José Garcia da Silva

USP/IFSC/SBI

8-2-001685

Tese apresentada ao Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências: Física Aplicada – Biomolecular.

Orientador: Prof. Dr. Richard Charles Garratt

Co-orientadora: Prof. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo

São Carlos – 2005

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

IFSC - SBI
CLASS T2 1685
CUTTER
TOMBO 1685

Silva, Wânius José Garcia
Estudos Estruturais e Bioquímicos das Septinas Humanas Bradeiona α e β/ Wânius José Garcia da Silva – São Carlos, 2005.

Tese (doutorado) – Instituto de Física de São Carlos (FSC), Universidade de São Paulo (USP), 2005.

Orientador: Prof. Dr. Richard Charles Garratt

1. Septinas Bradeiona α e β (SEPT4). 2. Expressão, purificação e caracterização de proteínas.

I. Título

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Física de São Carlos

Caixa Postal 369
13560-970 São Carlos, SP
Av. Trabalhador São-carlense, 400,
13560-970 São Carlos, SP

Fone/Fax 16 3373 9777
www.if.sc.usp.br
wladerez@ifsc.usp.br

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE WÂNIUS JOSÉ GARCIA DA SILVA APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 08/06/2005.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Richard Charles Garratt (Orientador e Presidente) – IFSC/USP

Profa. Dra. Glória Regina Franco – UFMG

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo – UFSCar

Prof. Dr. Emanuel Carrilho – IQSC/USP

Prof. Dr. Antonio José da Costa Filho – IFSC/USP

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Richard Charles Garratt pela competência que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

A Prof. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo pelos ensinamentos na área de biologia molecular durante o decorrer do trabalho.

Ao aluno de doutoramento Sandro Hillebrand pela rica colaboração e discussões relevantes sobre o trabalho realizado.

Aos professores Castellano e Otávio.

Aos amigos da Física, em particular Marcos (Marcão), Frederico (Latino), André (Cabeça), Lucas (Sujeito), Petrus, Neuza, Melissa, Cristina Nordi, Isabel, Andressa, Priscila, Suzana, Ney, Mario Sanches, André Ambrósio, João (Daileon), Claúdia Munti, Alexandre (bunda), José Ricardo.

Aos técnicos do grupo, Bel, Andressa, Beto, Suzana e Beth.

Aos meus pais e minha irmã pelo carinho durante to do doutorado.

À Fabíola Maffei Souto pelo amor, carinho, paciência e alegrias.

A FAPESP, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

Índice

1. Introdução: Septinas.....01

1.1 Septinas em levedura.....01

1.2 Atual nomenclatura padrão para septinas de mamífero.....02

1.3 Domínios estruturais de septinas.....03

1.4 Complexidade das septinas de mamíferos.....06

1.5 Diversidade e redundância das septinas de mamíferos.....09

1.6 Polimerização de filamentos de septinas.....09

1.7 Atividade GTPase em Septinas.....11

1.8 Chaves moleculares: pequenas GTPases.....11

1.9 Outras proteínas GTPase.....15

1.10 Gene SEPT4 (Bradeiona α e β).....15

2. Objetivos.....21

2.1 Objetivos específicos deste trabalho.....21

3. Metodologia.....23

3.1 Subclonagem.....23

3.1.1 Amplificação e subclonagem do cDNA da Bradeiona β.....23

3.1.2 Amplificação e subclonagem do cDNA do Fragmento conservado (FC).....27

3.1.3 Amplificação e subclonagem do cDNA do Domínio GTPase (DGTPase).....32

3.1.4 Amplificação e subclonagem do cDNA da Bradeiona α.....34

3.2 Expressão e purificação.....37

3.2.1 Expressão e purificação da proteína recombinante Bradeiona β.....37

3.2.2 Expressão e purificação do Fragmento conservado (FC) recombinante.....40

3.2.3 Expressão e purificação do Domínio GTPase recombinante.....42

3.2.4 Expressão da proteína recombinante Bradeiona α.....45

3.3 Cálculo da concentração protéica.....45

3.4 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD).....46

3.5 Espectroscopia de fluorescência.....47

3.6 Espalhamento dinâmico de luz (DLS).....48

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

3.7 Métodos de bioinformática.....48

3.8 Estudos enzimáticos através de eletroforese capilar (CE).....49

3.8.1 Dependência de um cofator para hidrolise do GTP (ATP).....52

3.8.1.1 Influência do Mg^{2+} na atividade da Bradeiona β.....52

3.8.1.2 Influência do Mg^{2+} na atividade do domínio GTPase.....53

3.8.1.3 Influência do Mn^{2+} na atividade do domínio GTPase.....54

3.8.2 Determinação da constante de Michaelis-Menten.....54

3.8.2.1 Determinação da constante de Michaelis-Menten: Bradeiona β – GTP.....56

3.8.2.2 Determinação da constante de Michaelis-Menten: DGTPase - GTP.....57

3.8.2.3 Determinação da constante de Michaelis-Menten: DGTPase – ATP.....57

3.9 Determinação do conteúdo de nucleotídeo unido.....57

3.10 Ensaios de cristalização.....58

3.11 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR).....59

3.12 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR).....60

4. Resultados e discussões.....61

3.1 Bradeiona β.....61

3.1.1 Subclonagem, expressão e purificação da Bradeiona β.....62

3.1.2 Análises estruturais da Bradeiona β.....71

3.1.3 Atividade GTPase da Bradeiona β.....75

3.1.4 Cristalização da Bradeiona β.....83

3.2 Fragmento conservado (FC).....87

3.2.1 Subclonagem, expressão e purificação do FC.....87

3.2.2 Análises estruturais do FC.....93

3.2.3 Ensaios de cristalização do FC.....99

4.3 Domínio GTPase (DGTPase).....99

4.3.1 Primeira definição dos limites do DGTPase (DGTPase1).....100

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

4.3.1.1 Subclonagem e expressão do DGTPase1 103

4.3.2 Segunda definição dos limites do DGTPase (DGTPase2) 105

4.3.2.1 Subclonagem, expressão e purificação do DGTPase2 107

4.3.2.2 Análises estruturais do 6xHis+DGTPase2 111

4.3.2.3 Atividade GTPase da proteína de fusão GST+DGTPase2 114

4.3.2.4 Estudo da especificidade da proteína de fusão GST+DGTPase 120

4.4 Bradeiona α 123

4.4.1 Subclonagem e expressão Bradeiona α 125

Referências bibliográficas 130

Apêndice A

Apêndice B

Lista de Figuras

Figura 1.1: Processo de brotamento em levedura auxiliado por filamentos de septinas....01

Figura 1.2: Árvore filogenética das septinas de humanos....02

Figura 1.3: Esboço ilustrativo dos domínios de uma septina....04

Figura 1.4: Alinhamento múltiplo das seqüências primárias de septinas de mamíferos....06

Figura 1.5: Filamentos formados pelas septinas de mamíferos SEPT2, SEPT6 e SEPT7. (A) Filamentos na forma de espirais. (B) e (C) Filamentos na forma de círculos....10

Figura 1.6: Ciclo em pequenas GTPases....12

Figura 1.7: Reação de catálise do GTP pela GTPase Rab5....13

Figura 1.8: Estrutura tridimensional da proteína RhoA humana....14

Figura 1.9: Proteínas Bradeiona α e β. (A) Seqüências de aminoácidos das proteínas Bradeiona α e β. (B) Construção genômica das proteínas Bradeiona α e β....17

Figura 1.10: (A) Estacionamento na fase G2 do ciclo celular em células de carcinoma colorectal, transfectadas com ribozimas e maxizimas especificas para Bradeiona α e β, observada através de citometria de fluxo. (B) Análise por RT-PCR do RNA mensageiro da Bradeiona....19

Figura 1.11: Supressão do crescimento de células de carcinoma colorectal em camundongos....20

Figura 3.1: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do cDNA da Bradeiona β e subseqüente subclonagem no vetor pGEX-5X-1....24

Figura 3.2: Reação de amplificação do cDNA da Bradeiona β....25

Figura 3.3: Reações de digestão do produto de PCR e do vetor pGEX-5X-1....25

Figura 3.3: Mistura de ligação do cDNA da Bradeiona β e o vetor pGEX-5X-1...26

Figura 3.5: Seqüência de aminoácidos na região de interface entre a proteína GST e a Bradeiona β....27

Figura 3.6: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do cDNA do FC e posterior subclonagem no vetor de expressão bacteriano pGEX-5X-1....28

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

Figura 3.7: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do cDNA do FC e posterior subclonagem no vetor de expressão bacteriano pET28a(+).....28

Figura 3.8: Reações de amplificação e ciclo de PCR da região que codifica o FC (para subclonagem nos vetores pGEX-5X-1 e pET28a).....29

Figura 3.9: Reações de digestão dos produtos de PCR (região que codifica o FC) e vetores de expressão bacterianos.....29.

Figura 3.10: Reação de ligação da região que codifica o FC nos vetores pGEX-5X-1 e pET28a(+).....30

Figura 3.11: Seqüência de aminoácidos na região de interface entre a cauda com histidinas (6xHis) e o FC.....31

Figura 3.12: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação de dois possíveis limites do cDNA do DGTPase (aminoácidos 124-408 e 144-416, respectivamente) e posterior subclonagem nos vetores de expressão pGEX-5X-1 e pET28a(+).....32

Figura 3.13: reação e ciclo de amplificação da região codificante do domínio GTPase.....33

Figura 3.14: Seqüência de aminoácidos na região de interface em cada construção elaborada (DGTPase).....34

Figura 3.15: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do cDNA da Bradeiona α e subseqüente subclonagem no vetor pGEX-5X-1.....35

Figura 3.16: Reação e ciclo de amplificação do cDNA da Bradeiona α.....35

Figura 3.17: Diagrama ilustrativo de um experimento de CE.....50

Figura 4.1: Amplificação do fragmento do gene da Bradeiona β e confirmação dos clones positivos por análise de restrição.....63

Figura 4.2: Expressão da proteína de fusão (Bradeiona β +GST).....64

Figura 4.3: Eluição da proteína de fusão com 10 mM de glutationa reduzida (GSH).....65

Figura 4.4: Eletroforese (SDS-PAGE 15%) ilustrando a cinética de clivagem da proteína de fusão utilizando a protease Fator Xa.....66

Figura 4.5: Eletroforese (SDS-PAGE 15%) mostrando a lavagem da resina após a clivagem na mesma com a protease Fator Xa.....67

Figura 4.6: Cromatografia de exclusão molecular da proteína Bradeiona β na resina Superdex 200.....68

Figura 4.7: Cromatografia de troca iônica da Bradeiona β em resina *Mono Q*.....69

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

Figura 4.8: Eletroforese (SDS-PAGE 15%) mostrando a proteína Bradeiona β após mudança de pH....70

Figura 4.9: Análise da proteína Bradeiona β através de DLS....72

Figura 4.10: Espectro de dicroísmo circular da proteína Bradeiona β....73

Figura 4.11: Separação de GTP e GDP por eletroforese capilar, após hidrólise enzimática....76

Figura 4.12: (A) Determinação da velocidade inicial através do ajuste dos pontos inicias da curva de hidrólise de GTP no decorrer do tempo. (B) Gráfico de Michaelis-Menten (Bradeiona β – GTP)....79

Figura 4.13: Reação de hidrólise de GTP em função da concentração de íons Mg^{2+}....81

Figura 4.14: (A) e (B) Cristais de Bradeiona β, na forma de placas, obtidos a 4° C pelo método de difusão de vapor. (C) Imagem ampliada de dois cristais de Bradeiona β. (D) Cristais de Bradeiona β na forma de agulhas (4°C). (E) Microcristais de Bradeiona β (4°C)....84

Figura 4.15: (A) Padrão de difração de um cristal de Bradeiona β. O cristal difratou a uma máxima resolução de 6,0 Å em uma fonte de raios X com anodo rotatório. (B) Cristais de Bradeiona β analisados por eletroforese desnaturante e posteriormente corado com prata....86

Figura 4.16: Amplificação do cDNA do Fragmento conservado (PCR) e confirmação dos clones positivos através de PCR de colônia....88

Figura 4.17: Expressão da proteína de fusão (Fragmento conservado fusionado a GST). Eletroforese (SDS-PAGE 15%) ilustrando extratos totais de *E. coli* AD202, durante 10 horas de indução com IPTG a 20°C....89

Figura 4.18: Perfil da cromatografia de exclusão molecular (Superdex-75) do Fragmento conservado....90

Figura 4.19: Purificação do FC em coluna de Ni-NTA....91

Figura 4.20: Purificação do FC recombinante....92

Figura 4.21: Análise do Fragmento conservado através de DLS....94

Figura 4.22: Espectro de dicroísmo circular do Fragmento conservado....94

Figura 4.23: Espectro de emissão de fluorescência do Fragmento conservado....95

Figura 4.24: Espectro H-1D do FC a 25°C em pH 6,3. Espectrômetro Varian Inova, operando a 14,1 T (600 MHz)....98

Figura 4.25: Alinhamento das seqüências das septinas de mamíferos....102

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

Figura 4.26: Limites escolhidos para o DGTPase da proteína Bradeiona β.....103

Figura 4.27: Expressão do DGTPase na linhagem bacteriana AD494(DE3). Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 15%).....103

Figura 4.28: Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 15%) dos testes de expressão dos limites escolhidos para o domínio GTPase.....104

Figura 4.29: Alinhamento do N-terminal e C-terminal de pequenas GTPases.....106

Figura 4.30: (A) Estrutura tridimensional da pequena GTPase RhoA. (B) Os dois limites definidos para o domínio GTPase da proteína Bradeiona β.....107

Figura 4.31:Amplificação da região que codifica o DGTPase2.....108

Figura 4.32: Purificação da proteína de fusão GST+DGTPase2.....109

Figura 3.33: Testes de expressão da proteína de fusão 6xHis+DGTPase.....109

Figura 4.34: Expressão e purificação da proteína de fusão 6xHis+DGTPase.....110

Figura 4.35: Análise o DGTPase através de DLS.....112

Figura 4.36: Espectro de CD do 6xHis+DGTPase.....113

Figura 4.37: Espectros de CD da proteína Bradeiona β, FC e 6xHis+DGTPase..114

Figura 4.37: Gráfico de Michaelis-Menten: velocidade inicial da reação em função da concentração de substrato.....115

Figura 4.38: Comportamento da atividade GTPase em função da concentração de íons Mg^{2+}.....116

Figura 4.39: Porcentagem de GTP convertido pela fusão GST+DGTPase durante diferentes tempos de incubação com 0,5 mM de $MgCl_2$ ou $MnCl_2$ em comparação com o controle (ausência de íons).....117

Figura 4.40: Análise através de EPR. (A) Azul: Mn^{2+} livre em solução. Preto: solução equimolar de Mn^{2+} e GTP. (B) Vermelho: Mn^{2+} livre em solução. Azul: Mn^{2+} na presença de GTP na proporção 1:4. Perto: Mn^{2+} n presença de GST+DGTPase na proporção 1:4.....119

Figura 4.41: Gráficos de Michaelis-Menten. (A) GST+DGTPase/GTP. (B) GST+DGTPase/ATP.....121

Figura 4.42: Estrutura do sítio de ligação a GTP da pequena GTPase Ras.....122

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

Lista de Tabelas

Tabela 1.1: Nomenclatura padrão para septinas de mamíferos (camundongo e humano). Tabela extraída da referência [5], não incluindo as septinas SEPT11 e SEPT12 que foram caracterizadas posteriormente.....03

Tabela 3.1: Plasmídeos e linhagens bacterianas utilizadas. A terceira coluna indica o primeiro e último aminoácido da proteína de interesse considerando-se a seqüência primária completa da Bradeiona β (não se considera a seqüência primária da proteína carreadora GST). (1) e (2) indicam dois limites diferentes escolhidos para o domínio GTPase. Os dois primeiros plamídeos da tabela (cedidos pela Dr. M. Tanaka) foram utilizados de moldes iniciais na elaboração dos outros sistemas de expressão citados.....36

Tabela 3.2: Parâmetros pertinentes de cada proteína recombinante analisada: massa molecular (M.M.), coeficiente de extinção teórico (ε), ponto isoelétrico (pI) e resíduos fluorescentes (R).....46

Tabela 3.3: Análise da influência de íons Mg^{2+} na atividade GTPase da proteína Bradeiona β. Experimentos 1-4: reações com distintas concentrações de co-fator. Experimentos 5 e 6: controles na ausência de proteína e de íons Mg^{2+}.....53

Tabela 3.4: Análise da influência de íons Mg^{2+}, na atividade GTPase do domínio GTPase. Experimentos 1-7: reações com distintas concentrações de co-fator. Experimentos de 8-12: controles na presença de íons Mg^{2+} e ausência de proteína. Experimento 13: controle na presença de proteína e ausência de íons Mg^{2+}.....53

Tabela 3.5: Análise da influência de íons Mn^{2+}, na atividade GTPase do DGTPase. Experimento 1: reação na presença de íons Mn^{2+}. Experimento 2: reação na presença de íons Mg^{2+}. Experimento 3: controle na presença de proteína e ausência de íons Mn^{2+} e Mg^{2+}.....54

Tabela 3.6: Determinação da constante de Michaelis-Menten. Experimentos 1-7: reações com distintas concentrações de GTP. Experimentos 3-5: triplicata de uma mesma reação, com concentração de 3 mM de GTP. Experimentos de 8-12: controles na presença de íons Mg^{2+} e ausência de proteína. Experimento 13: controle na presença de proteína e ausência de íons Mg^{2+}.....55

Tabela 3.7: Determinação da constante de Michaelis-Menten. Experimentos 1-9: reações com distintas concentrações de GTP. Experimentos 5-7: triplicata da mesma reação, com concentração de 3 mM de GTP. Experimentos de 10-16: controles na presença de íons Mg^{2+} e ausência de proteína. Experimento 17: controle na presença de proteína e ausência de íons Mg^{2+}.....56

Tabela 4.1: Predição de estrutura secundária da proteína Bradeiona β e de seus domínios estruturais através do programa PSIPRED.....74

Lista de abreviaturas e siglas

ATP – adenosina 5'-trifosfato
ADP – adenosina 5'-difosfato
AD202 – linhagem bacteriana para expressão
$CaCl_2$ – cloreto de cálcio
CD – dicroísmo circular
CE – eletroforese capilar
DH5α – linhagem bacteriana para propagação plasmideal
DLS – espalhamento dinâmico de luz
DGTPase – domínio GTPase
DO – densidade óptica
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
EF-Tu – fator de elongação
EPR – ressonância paramagnética nuclear
ER2566 – linhagem bacteriana para expressão
FC – Fragmento conservado
GAP - proteína de ativação
GDP – guanosina 5'-difosfato
GTP – guanosina 5'-trifosfato
GTPγS – análogo não hidrolisável do GTP
GSH – glutationa reduzida
GST – glutationa S-transferase
6xHis-tag – cauda com histidinas
IPTG – isopropil-1-β-tiogalactopiranosideo
KCl – cloreto de potássio
k_{cat} – constante de catálise
K_m – constante de Michaelis-Menten
LB – meio de cultura
$MgSO_4$ – sulfato de magnésio
Mg^{2+} - íon magnésio
Mn^{2+} - íon manganês
Ni-NTA – resina de afinidade de níquel
PCR – reação de polimerização em cadeia
pET28a(+) – vetor de expressão bacteriano (fusão com *His-tag*)
pGEX-5X-1 – vetor de expressão bacteriano (fusão com GST)
pI – ponto isoelétrico
P-loop – *loop* de interação com fosfato
PMSF – phenylmethylsufonyl fluoride
PtdIns(4,5)P2 – fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PVA – poly(vinyl alcohol)
RMN – ressonância magnética nuclear
SDS-PAGE – gel de poliacrilamida desnaturante
SEC – cromatografia de exclusão molecular
SELCON – *Self-consistent method*
SW480 – linhagem celular
λ - comprimento de onda
[θ] – elipticidade molar
ε – coeficiente de extinção molar

Resumo

Septinas constituem uma família de proteínas de ligação a GTP que foram inicialmente identificadas em levedura *Saccharomyces cerevisiae*, mas também estão presentes em outros eucariotos com exceção de plantas. Septinas são purificadas de leveduras, *Drosophila* e cérebros de mamíferos na forma de filamentos, porém o mecanismo através do qual acorre à formação destes filamentos ainda não é muito bem compreendido. Septinas são constituídas de três regiões principais: um N-terminal variável, um domínio central GTPase altamente conservado e um domínio *coiled-coil* C-terminal. O gene *SEPT4* foi identificado por M. Tanaka e colaboradores a partir do cDNA de cérebro humano e apresentou duas distintas transcrições: Bradeiona α e β. Interessantemente, além de cérebro e coração, as proteínas Bradeiona α e β são detectadas somente em câncer do cólon, reto, próstata e melanoma maligno. Neste trabalho, o gene da proteína Bradeiona β foi subclonado em um vetor de expressão bacteriano, produzido em *E. coli* e purificado com sucesso. O espectro de dicroísmo circular (CD) mostrou o perfil característico de proteínas com hélices α na estrutura secundária. Resultados de cromatografia de exclusão molecular (SEC) e espalhamento dinâmico de luz (DLS) indicam que a septina Bradeina β foi produzida na forma de um estável oligômero com características monodispersivas, que foi subsequentemente cristalizado em PEG6000. A atividade GTPase da Bradeiona β foi comprovada através da técnica de eletroforese capilar (CE), mostrando-se absolutamente dependente de íons Mg^{2+}. Inibição da atividade GTPase foi verificada em altas concentrações de Mg^{2+} (maiores que 5 mM). Com a finalidade de caracterizar os domínios preditos da Bradeiona β (Fragmento Conservado e domínio GTPase), essas regiões foram previamente definidas, expressas em *E. coli* e purificadas com sucesso. Resultados de CD, SEC, espectroscopia de fluorescência e NMR-600MHz indicam que o FC foi produzido na forma de um estável monômero com pouca estrutura secundária regular. Resultados de DLS e CD indicam que a fusão 6xHis-DGTPase foi produzida na forma de um oligômero com a presença de hélices α na estrutura secundária. A fusão 6xHis-DGTPase mostrou-se instável a altas concentrações na ausência de imidazol. A atividade GTPase da fusão GST+DGTPase foi comprovada, similarmente a Bradeiona β, através da técnica de CE. Novamente, verificou-se dependência de íons Mg^{2+} (para a atividade catalítica) e inibição em altas concentrações de Mg^{2+}. A fusão GST+DGTPase também foi capaz de hidrolisar ATP. Espera-se que as informações relatadas neste estudo proporcionem um alicerce para estudos estruturais/funcionais futuros das proteínas Bradeiona α e β e outras septinas.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

Abstract

Septins form a class of eukaryoyic guanine nucleotide-binding proteins that were first identified in budding yeast. Septins purified from yeast, *Drosophila* and mammalian brain form filaments, however the mechanism by which the filaments assemble is unclear. Septins have a highly conserved structure, which includes a central GTP-binding domain, a variable N-terminal region, and most septins also contain a coiled coil domain at the C-terminus. Bradeion β is one of the splice variants of the human septin gene, *SEPT4*, recently isolated by expression screening of an adult human brain cDNA library. The Bradeion gene resides at 17q23, and has been shown to present specific expression in both human colorectal cancer, urologic cancers and malignant melanoma. In order to characterize the GTPase activity of Bradeion β, the protein was successfully expressed in *E. coli* and purified. The recombinant protein was characterized by circular dichroism (CD), dynamic light scattering (DLS) and a novel non-radioactive enzyme assay, which utilizes capillary electrophoresis (EC) to monitor GTP hydrolysis. The CD spectrum exhibited the typical shape characteristic of the presence of helical elements of secondary structure and the DLS pattern was indicative of a monodisperse solution, which was readily crystallized in the presence of PEG6000. GTP hydrolysis was shown to be Mg^{2+}-dependent within the low millimolar range but at 5 mM was inhibitory. In order to characterize the predicted domains of Bradeion β, these defined regions were successfully expressed in *E. coli* and purified. The CD spectrum of CF exhibited the shape typically found for non-regular structure. The results of fluorescence spectroscopy, gel filtration (SEC) and NMR-600MHz also corroborate with the CD results indicating an irregular structure. The fusion protein 6xHis-DGTPase exhibited a CD spectrum with the typical shape characteristic of the presence of helical elements but was show to be instable at high concentrations in the absence of imidazole. To characterize the GTPase activity of the fusion protein GST+DGTPase, the CE technique was used to monitor GTP hydrolysis. Analysis by CE showed that GST+DGTPase was functional, since both GTP and ATP hydrolysis was observed in a Mg^{2+} dependent manner. This work provides novel approaches, which should aid in the future study of the structure and function of Bradeion α and β, others septins and related GTPases.

Capítulo 1

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO

Introdução

1.1 *Septinas em levedura*

Septinas constituem uma família de proteínas de ligação a GTP inicialmente identificadas em levedura *Saccharomyces cerevisiae*, entretanto, também estão presentes em outros eucariotos com exceção de plantas [1-3]. O primeiro grupo de genes de septinas identificados em levedura, CDC3, CDC10, CDC11 e CDC12 revelou-se importante para o processo normal de brotamento. Septinas purificadas de leveduras reúnem-se em filamentos de comprimento variável e diâmetro de 7-9 nm, e auxiliam na separação dos componentes das membranas das células mãe e filha [1]. Filamentos de septinas, auxiliando no processo de brotamento em leveduras estão ilustrados na figura 1.1 [4].

Figura 1.1: Foto obtida por microscopia eletrônica de transmissão [4]. Processo de brotamento em levedura auxiliado por filamentos de septinas (veja setas). A barra branca (escala) na parte inferior da figura designa 0,1 μm.

Filamentos similares também foram observados em *Drosophila* e cérebro de mamíferos, porém o mecanismo através do qual ocorre à formação destes filamentos, até então, não é muito bem compreendido [2,3].

1.2 *Atual nomenclatura padrão para septinas de mamíferos*

Os membros da família de septinas de mamíferos (humanos e camundongos) podem ser classificados em quatro grupos, considerando as seqüências de aminoácidos [5]. A árvore filogenética de septinas de mamíferos está esquematizada na figura 1.2.

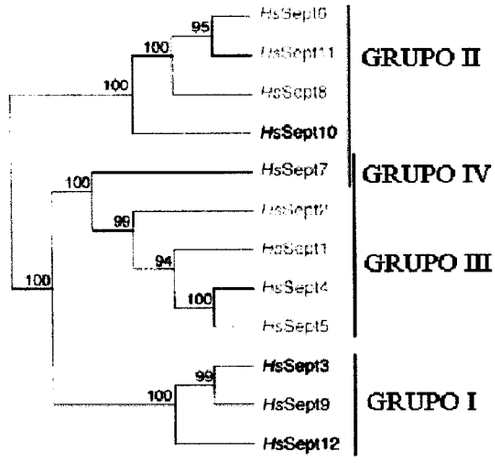


Figura 1.2: Árvore filogenética das septinas de mamíferos. Septinas com pontos isoelétricos (pI) ácidos, neutros e básicos são respectivamente indicadas pelas cores marrom, preto e azul. Figura extraída da referência [5].

Recentemente, Ian Macara e colaboradores propuseram uma nomenclatura padrão para as septinas de mamíferos porque os diferentes nomes empregados na literatura científica podiam causar confusão [6]. Assim, optou-se pela nomenclatura padrão em acordo com a Human Genome Organization (HUGO) e Mouse Genomic Nomenclature (MGN). Para septinas de humano, aprovou-se a nomenclatura *SEPT1-SEPT12* para os genes e SEPT1-SEPT12 para os correspondentes produtos gênicos. Para septinas de camundongo, adotou-se a nomenclatura *Sept1-Sept12* para os genes e SEPT1-SEPT12 para

os correspondentes produtos gênicos. *Splicing* variantes passaram a ser designados por um traço baixo, seguido da letra *v* e um número (veja tabela 1.1).

Approved mouse septin nomenclature (Locus/ protein)	Approved human septin nomenclature (Locus/ protein)	Mouse, rat septin aliases[a]	Mouse, rat GenBank accession nos. (selected)	Human septin aliases	N-terminal sequence (human, longest splice variant)	C-terminal sequence (human, longest splice variant)	Human GenBank accession nos (selected)	Human chromosome locus
Sept1/SEPT1	*SEPT1*/SEPT1	Diff6, Septin1	M37030, NM_017461	SEPT1	MDKEYVGF	QGEQSDAL.	NM_052838	16p11.1
Sept2/SEPT2	*SEPT2*/SEPT2	Nedd5, Septin2	NM_010891, D49382	Nedd5, Pnutl3, Diff6, KIAA0158	MSKQQPTQ	GGALGHHV.	NM_004404, AF038404	2q37.3
Sept3/ SEPT3_v1–3[b]	*SEPT3*/ SEPT3_v1–2[c]	G-septin(α,β,γ), Septin3(A–C)	AF111179(α), AF111180(β), AF111181(γ), NM_011889, NM_019375	Sep3[c]	MSELVPEP	EESHDSNP.	NM_019106	22q13.2
Sept4/ SEPT4_v1–6	*SEPT4*/ SEPT4_v1–6	H5, Sep4	NM_011129	H5, Bradeion(α,β), Pnutl2(variants 1–4), hCDCrel-2(a–b), ARTS,[d] MART[d]	MDRSLGWQ	QKQMKENY.	NM_004574, NM_080415–7, AF176379, AB008753, AB002110	17q23
Sept5/SEPT5	*SEPT5*/SEPT5	Cdcrel-1 Pnutl1[e]	NM_053931	Pnutl, hCDCrel-1A, B	MSTGLRYK	MKQQMQDQ	Y11593, NM_002688	22q11.2
Sept6/SEPT6	*SEPT6*/SEPT6_v1–6	Septin6	NM_019942	SEPT2, Septin6(I–VI), KIAA0128	MAATDIAR	KRDKEKKN.	AF403058–62, AB023622,	Xq24
Sept7/SEPT7	*SEPT7*/SEPT7	Septin7, Cdc10	NM_022616	hCdc10	MVAQQKNLE	NKKKGKIF.	AF142759, NM_001788	7q36.1
Sept8/SEPT8	*SEPT8*/SEPT8		AA636820 (partial)	KIAA0202	MAATDLERPS[f]	RKDKDKKN.	D86957, BAA13193.1	5q31
Sept9/ SEPT9_v1–5	*SEPT9*/ SEPT9_v1–5	Sint1, Sep9, E-septin, SLP-a	NM_017380, AJ250723	AF17q25 gene, MSF(a–d), SEPT9, SepD1, Ov/Br septin, Pnutl4, KIAA0991	MKKSYSGGTR	EKEPEAPEM.	NM_006640, AB023208, AF189712, AF123052	17q25.3
Sept10/SEPT10	*SEPT10*/SEPT10		AV254985 (partial)	SEPT10, Sep1-like	MASSEVARHL	QGQYISQSE.	AF146760	8q11.23

Tabela 1.1: Nomenclatura padrão para septinas de mamíferos (camundongo e humano). Tabela extraída da referência [6], não incluindo as septinas SEPT11 e SEPT12 que foram caracterizadas posteriormente.

1.3 *Domínios estruturais de septinas*

Septinas apresentam, em geral, uma estrutura composta de três domínios [7]. Um desenho esquemático dos domínios e motivos principais de septinas está ilustrado na figura 1.3(A). O domínio central GTPase é altamente conservado entre septinas da mesma espécie (com uma mínima similaridade seqüencial de 70% [8]), caracterizando-se pela presença do motivo Walker A *box* ou *P-loop* (G1, **GXXXXGK[S** ou **T])** [9] e outros motivos conservados de interação com GTP: os motivos G3 (**DXXG**) e G4 (**XKXD**). Porém, em alguns *splicing* variantes um ou mais motivos de interação com GTP podem

estar ausentes, como é caso das septinas SEPT4(ARTS) (ausência do motivo G4) e SEPT4(Bradeiona α) (ausência de todos os motivos de interação com GTP) [10,11]. Em pequenas GTPases, como Ras, o motivo G1 possui a finalidade de posicionar a molécula de GTP dentro do sítio ativo da proteína (coordenando os três fosfatos da molécula) [9]. O motivo G4 possui a finalidade de reconhecer o anel de guanina do GTP, ou seja, de proporcionar especificidade por nucleotídeo. Outras duas regiões menos conservadas, G2 e G5, estão presentes em pequenas GTPases e ausentes em septinas [9].

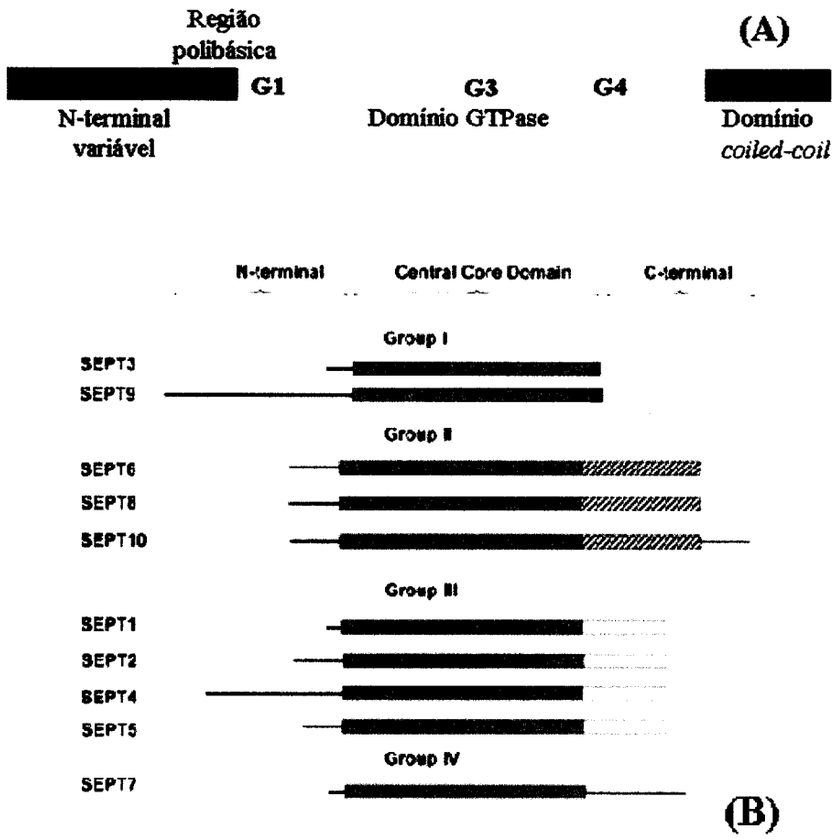


Figura 1.3: **(A)** Diagrama esquemático dos domínios de uma septina. Em azul escuro, domínio N-terminal variável. Em azul claro, domínio central GTPase. Os três motivos de interação com nucleotídeo estão representados por G1 (Walker A *box*), G3 e G4. Em marrom, domínio *coiled-coil* evidenciado por isoleucinas/leucinas a cada sete resíduos. Em preto, região polibásica. **(B)** Classificação das septinas considerando seus domínios estruturais. O domínio GTPase central é altamente conservado apresentado uma similaridade seqüencial mínima de 70%. O domínio C-terminal apresenta uma similaridade seqüencial entre 50-60%. Regiões não similares são indicadas no diagrama por linhas. Figura extraída da referência [8].

O domínio N-terminal é variável em septinas, como ilustrado na figura 1.3(B). Contudo, muitas septinas possuem um C-terminal predito como um domínio *coiled-coil* apresentando uma similaridade seqüencial de 50-60% entre as septinas de mamíferos [8]. Um domínio *coiled-coil* é caracterizando pela presença de leucinas a cada sete resíduos, o qual pode ser responsável pela interação entre proteínas (dimerização ou trimerização) [7]. As septinas SEPT3, SEPT9 e SEPT12 não apresentam o domínio *coiled-coil*, diferentemente das outras septinas (veja figura 1.3(B)).

O alinhamento das seqüências primárias das septinas de mamíferos (veja figura 1.4 [12]) revela uma região polibásica altamente conservada, próxima ao motivo *P-loop* (**(B/N)(B/N)BNN(B/N)(B/N)**, onde **B** são aminoácidos básicos e **N** neutros). Esta região na proteína SEPT4/H5 liga-se ao fosfolipídio fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PtdIns(4,5)P_2) e também pode conferir associação a membrana [13]. Contudo, a função e o papel fisiológico desta região polibásica em *in vivo* são desconhecidos [8]. Região similar de interação com PtdIns(4,5)P_2 também esta presente na proteína Gelsolina (KSGLKYKK, aminoácidos 135-142) [13].

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

Figura 1.4: Alinhamento múltiplo das seqüências primárias de septinas de mamíferos. Os aminoácidos idênticos são mostrados com fundo preto. Alinhamento extraído da referência [12]. As proteínas são identificadas na figura através de seus antigos nomes (veja tabela 1.1).

1.4 *Complexidade das septinas de mamíferos*

Como mencionado na seção 1.1, filamentos de septinas foram observados em leveduras, *Drosophila* e mamíferos. O protótipo do complexo de septinas foi isolado de embriões de *Drosophila* por cromatografia de imuno-afinidade através de uma de suas subunidades, Pnut [2]. Estes complexos filamentosos são compostos de três polipeptídeos: as septinas Sept1, Sept2 e Pnut, na proporção estequiométrica de aproximadamente 1:1:1. Complexos de septinas de mamíferos purificados de tecidos e células são estruturalmente muito similares a complexos de septinas de insetos [3,14]. Contudo, estes complexos

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

encerram mais do que três proteínas com uma estequiometria incerta, sugestionando complexos de distintas composições. Esta característica é devido à alta complexidade e redundância das septinas de mamíferos (são relatados cinco genes de septinas em *Drosophila* contra doze genes em humanos e camundongos).

Um simples complexo de septinas de mamíferos, com uma estequiometria de 1:1:1 foi isolado de células NIH3T3 através de cromatografia de afinidade utilizando a proteína carreadora GST em fusão com Borg3 [15]. As três septinas, SEPT2, SEPT6 e SEPT7 são ortólogas das septinas de *Drosophila* Sept1, Sept2 e Pnut, respectivamente. Portanto, o simples complexo de septinas de mamíferos pode ser considerado como um análogo do complexo de septinas de insetos. O complexo formado pelas proteínas SEPT2/6/7 pode ser utilizado como um modelo para análises bioquímicas e estruturais dos complexos de septinas de mamíferos. Não obstante, tentativas descritas na literatura em reconstituir o complexo *in vitro* através de polipeptídeos recombinantes não tiveram êxito. Uma das causas atribuídas é a insolubilidade da proteína SEPT7 quando expressa individualmente em bactéria [16] ou em células de eucariotos [14].

Em contraste, a expressão das proteínas SEPT6 e SEPT7 utilizando um vetor bicistrônico produziu o complexo heterodímérico na forma solúvel, estável e com uma estequiometria de aproximadamente 1:1 [14,16]. Desse modo, especula-se que a formação do heterodímero, o qual requer interação entre os domínios *coiled-coil* C-terminal [7,14] das proteínas SEPT6 e SEPT7, talvez exerça um papel crítico para o correto enovelamento e/ou para impedir a agregação da proteína SEPT7. Embora complexos de septinas incompletos e polipeptídeos de septinas livres possam ser degradados em células de inseto e camundongos [14,17], complexos parciais de septinas (na ausência de uma subunidade) são estáveis em leveduras [18]. Em conjunto, as informações descritas indicam que os complexos de septinas podem não somente consistirem de complexos canônicos

(complexo com três monômeros distintos), mas potencialmente conter traços parciais de hetero-oligômeros, homo-oligômeros e polipeptídeos livres.

Através da co-expressão da septina SEPT2 com o complexo parcial SEPT6/7, estáveis complexos SEPT2/6/7 com um estequiometria de aproximadamente 1:1:1 foram obtidos [16]. Os complexos SEPT2/6/7 expressos em bactéria são em sua maior parte partículas com massa de aproximadamente 256 kDa, a massa molecular de um hexâmero na estequiometria de 2:2:2 [16]. Em oposição, quando os polipeptídeos SEPT2/6/7 são co-expressos em células de inseto, complexos filamentosos com maior tamanho molecular são predominantes [14]. Portanto, o ambiente bacteriano pode não ser favorável para formação ou manutenção dos filamentos de septinas. É bem conhecido que a geração funcional de monômeros de actinas e heterodímeros de tubulinas dependem de um sistema específico de chaperonas. Talvez, o enovelamento de polipeptídeos de septinas e a formação de oligômeros funcionais possam requerer, da mesma forma, algum mecanismo ativo auxiliar.

Diferentemente dos filamentos de septinas de insetos e leveduras, a periodicidade estrutural dos filamentos nativos de septinas de mamíferos não foi consistentemente demonstrada por microscopia eletrônica [3,14]. Tal irregularidade pode ser atribuída, ao menos em parte, às complexas misturas de várias composições. Os filamentos recombinantes formados pelas septinas SEPT2/6/7 expressos em qualquer eucarioto ou sistema bacteriano também apresentaram falta de periodicidade estrutural [14,16]. Filamentos de septinas de inseto ou levedura, os quais são compostos em sua maior parte de complexos canônicos, possuem filamentos com comprimentos irregulares [1,2]. Portanto, alguma irregularidade pode ser inerente a arquitetura de filamentos de septinas. Cuidadosos estudos adicionais são necessários para elucidar a estrutura destes filamentos.

1.5 *Diversidade e redundância das septinas de mamíferos*

A classificação baseada em homologia, descrita na seção 1.2, está de acordo com a compatibilidade na formação do complexo recombinante analisado em células de inseto [5,19]. SEPT1, SEPT2, SEPT4 e SEPT5 podem formar separadamente um complexo equimolar com o complexo parcial SEPT6/7, resultando no complexo SEPTX/6/7 com estequiometria de aproximadamente 1:1:1 (onde, X = 1,2,4, ou 5). SEPT6 no complexo SEPT2/6/7 pode ser substituída por SEPT11, e provavelmente por SEPT8 ou SEPT10. SEPT7 é única e pode não ser substituível. Em outras palavras, o complexo parcial SEPT6/7 (grupos 2 e 4) interage apenas com uma septina do grupo 3. A SEPT6 (grupo 2) só pode ser substituída no complexo SEPT2/6/7 por uma septina do próprio grupo.

Investigações para compreender as regras que ditam os constituintes dos complexos de septinas ainda são necessárias. A redundância e a permutação entre subunidades de septinas, podem contribuir para o repertório de diversidade dos complexos em uma forma combinatorial. No entanto, ainda é incerto se os complexos com diferentes composições possuem distintas propriedades funcionais e bioquímicas, necessitando de mais estudos para elucidar a questão.

1.6 *Polimerização de filamentos de septinas*

O complexo recombinante SEPT2/6/7 produzido em células de inseto é purificado na forma de filamentos em tampão de moderada para alta força iônica, 0,1 – 0,5 M KCl acrescido de 0,1 M de imidazol, a uma concentração de aproximadamente 0,1 mg/mL (~0,35 μM) [5,14]. Reduzindo-se a força iônica abaixo de 0,15 M de KCl através de diálise, os filamentos de septinas tornam-se mais longos [14] como ocorre com os complexos nativos de septinas purificados de leveduras e insetos [2,18]. Após longo tempo

de incubação, anéis e espirais de 0,6 ± 0,1 μm em diâmetro são predominantes (veja figura 1.5). A partir de que estas estruturas são estáveis após diluição ou sobre alta força iônica, a polimerização dos filamentos parece ser um processo irreversível *in vitro*. A polimerização ocorre na presença ou ausência de nucleotídeos e a razão ligada GDP:GTP permanece invariável durante todo o processo [14]. Portanto, a polimerização dos filamentos de septinas em espirais e anéis é indiferente da complexação com nucleotídeos ou a hidrólise dos mesmos.

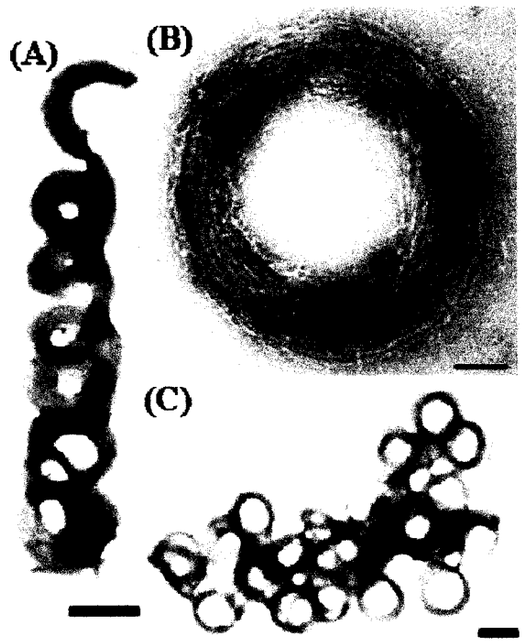


Figura 1.5: Foto obtida por microscopia de transmissão. Filamentos formados pelas septinas de mamíferos SEPT2, SEPT6 e SEPT7. (A) Filamentos na forma de espirais. (B) e (C) Filamentos na forma de círculos. A barra fina (escala) indica 100 nm e as barras grossas 500 nm. Figura extraída da referência [14].

1.7 *Atividade GTPase em Septinas*

Septinas pertencem à superfamília das GTPases por possuírem motivos GTPases conservados (Walker A *box*, G3 e G4) e atividade catalítica associada ao domínio central. Além deste fato, as estruturas primárias de septinas são similares as estruturas das pequenas GTPases (Ras, RhoA, etc.), Tubulina e FtsZ. Outra característica importante é o fato dos complexos de *Drosophila* Sept1/Sept2/Pnut e de mamífero SEPT2/SEPT6/SEPT7 (nativos ou produzidos através de expressão heteróloga) serem purificados unidos a nucleotídeos de guanina [2,14]. A estequiometria é de um nucleotídeo para cada polipeptídio, com uma razão GDP:GTP de 2:1–3:1. No caso dos filamentos de SEPT2/6/7, a razão GDP:GTP aparentemente não muda após incubação a 37°C por períodos superiores a 2 h, indicando que o GTP existente não é hidrolisado [19]. Em oposição, GTP radiativo unido aos complexos Sept1/Sept2/Pnut e SEPT2/6/7 foi hidrolisado em condições similares [2,16]. Contudo, a hidrólise não é rápida em nenhum dos casos, provavelmente limitada pela lenta reação de troca. Não há evidências que a ordem da polimerização dos filamentos de SEPT2/6/7 depende da troca e/ou hidrólise de nucleotídeos de guanina [19]. Portanto, a união e/ou hidrólise do GTP podem estar relacionadas com a despolimerização da estrutura dos filamentos, ou no processo prévio de formação dos complexos filamentosos.

1.8 *Chaves moleculares: pequenas GTPases*

A chave molecular GTPase é um versátil dispositivo utilizado universalmente para regular caminhos bioquímicos. Estudos com a proteína EF-Tu (fator de elongação) em *Escherichia coli* e proteínas G em células de mamíferos tentam estabelecer com maior precisão as características desta chave biológica, ou seja, a habilidade de sofrer mudança

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

conformacional dependente de nucleotídeo de guanina. Em outras palavras, a função das GTPases é regulada pela conversão entre as formas unidas com GTP e GDP, atuando como uma chave molecular que regula caminhos de sinalização celular [9]. De fato, todas as GTPases são inativas quando unidas a GDP porém, adotam uma conformação ativa quando este é substituído por GTP. A proteína ativada é capaz de reconhecer uma molécula alvo para produzir um efeito característico, enquanto, a atividade de catálise GTPase assegura que a chave permaneça ativa somente por um determinado intervalo de tempo [9]. A figura 1.6 ilustra o ciclo do GTP/GDP em pequenas GTPases.

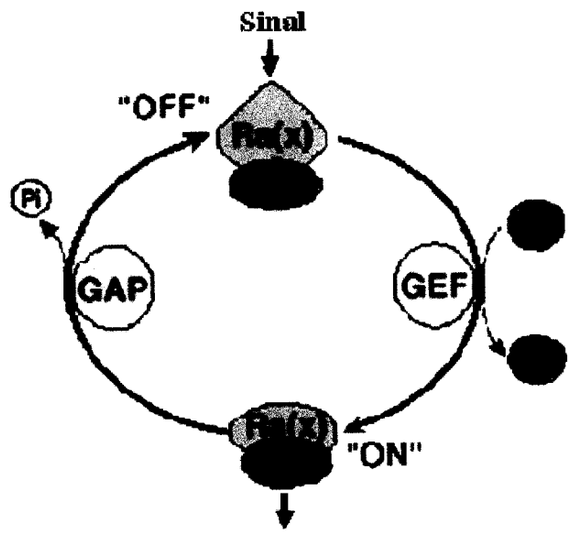


Figura 1.6: Ciclo em pequenas GTPases. A proteína unida com GTP (verde) esta na forma ativa e unida com GDP (vermelho) na forma inativa. A proteína de ativação GTPase (GAP) e o fator de troca de nucleotídeo (GEF) estão ilustradas em cinza. O fosfato (Pi) liberado após hidrólise do GTP esta ilustrado em amarelo.

Células de eucarioto, provavelmente, utilizam centenas de GTPases para controlar processos biológicos desde a síntese protéica para o crescimento celular, divisão celular e transporte de proteínas marcadas. Para muitas GTPases a taxa de conversão entre as formas unidas com GTP (ativa) e GDP (inativa) é modulada por fatores externos, como fatores de troca de nucleotídeo de guanina, inibidores de dissociação de nucleotídeo de guanina e proteínas de ativação GTPase. Muitas GTPases são dependentes de cofator (Mg^{2+}) para

coordenar e hidrolisar a molécula de GTP [20,21]. No caso da proteína Rab5 e outras pequenas GTPases (Ras-*like*), verifica-se que a dissociação do GDP é reduzida ou mesmo inibida para certos valores fisiológicos de íons Mg^{2+} (> 1,5 mM) [21]. Na figura 1.7 esta ilustra a reação catalisada pela proteína Rab5.

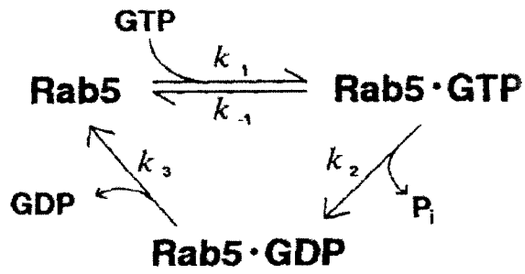
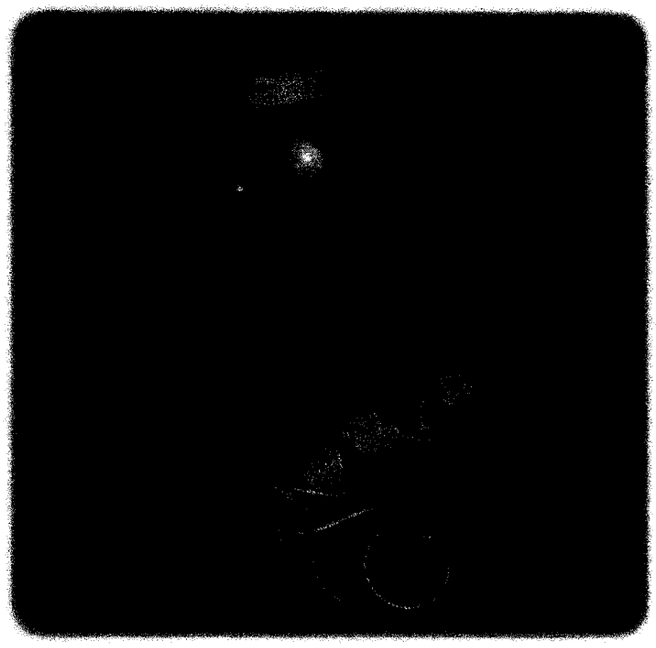


Figura 1.7: Reação de catálise do GTP pela GTPase Rab5. As constantes de dissociação microscópicas são representadas por k_1, k_{-1}, k_2 e k_3.

A pesquisa na área de pequenas GTPases destaca-se como um fundamental ponto para compreender muitos fenômenos biológicos correntemente sobre investigação. Com base na estrutura e critérios funcionais, as pequenas GTPases podem ser divididas em seis principais subfamílias: Ras, Rho, Rab, Arf, Sar e Ran [9]. A estrutura tridimensional da proteína RhoA humana unida com GTPγS (um análogo não hidrolisável do GTP) e detalhes do sítio de ligação estão ilustrados na figura 1.8 [22].

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO



(A)

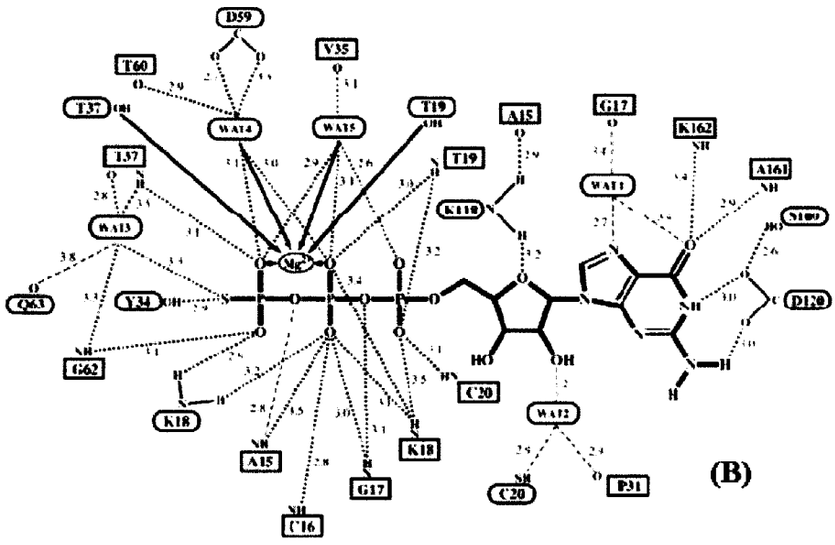


Figura 1.8: Proteína RhoA humana. **(A)** Estrutura tridimensional da proteína RhoA humana. O motivo *P-loop* está destacado em cor azul escuro. A molécula de GTPγS (um análogo do GTP não hidrolisável) coordenada pelo íon Mg^{2+} (cinza) também pode ser visualizada. **(B)** Interações entre os resíduos dos motivos GTPases da proteína RhoA, o íon Mg^{2+} e a molécula GTPγS. Figura extraída do artigo [22].

1.9 *Outras proteínas GTPase*

Como discutido na seção 1.8, pequenas GTPases são proteínas que exercem a função de chaves moleculares reguladas pela união com GTP (ativa) e GDP (inativa). A hidrólise e dissociação do GTP somente ocorrem na presença de proteínas ativadoras e fatores de troca de nucleotídeos. Porém, existem proteínas GTPases que não possuem função de sinalização e sim função estrutural. A proteína FtsZ, por exemplo, é uma proteína essencial no maquinário de divisão celular de procariotos [23]. FtsZ é uma homologa da proteína de eucariotos Tubulina, que pertence a uma distinta família de proteínas GTPases que formam filamentos modulados por GTP [24].

Similarmente a Tubulina, a atividade GTPase da proteína FtsZ é induzida pelos contatos do monômero no próprio polímero (filamento protéico). Deste modo, a própria FtsZ realiza o papel de sua proteína ativadora e de seu fator de troca de nucleotídeo. Diferentemente de septinas, a proteína FtsZ forma apenas filamentos constituído de monômeros idênticos. Portanto, septinas são um novo grupo de GTPases que são distintas de pequenas GTPases e outras proteínas GTPases bem estudadas, ou seja, de função e papel fisiológico bem determinado.

1.10 *Gene SEPT4 (Bradeiona α e β).*

O gene *SEPT4*, localizado na posição cromossômica 17q23, foi identificado por Manami Tanaka e colaboradores a partir do cDNA de cérebro humano adulto, através de um *screening* com o anticorpo monoclonal CE5 [11]. *Northern blot* e análises de hibridização em *situ* mostraram que o gene *SEPT4* possui duas distintas transcrições (veja figura 1.9), com aproximadamente 2,2 kb e 1,7 kb em comprimento (Bradeiona α e β,

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

respectivamente), expressos principalmente em cérebro e levemente em coração, porém ausentes em órgãos fetais [11].

Similarmente a outras septinas de mamíferos (veja seção 1.3), a proteína Bradeiona β possui os motivos conservados de interação com GTP: os motivos *P-loop* (**G**ESGL**GKS**, resíduos números 151-158), G3 (**DESG,** resíduos 239-242) e G4 (**AKAD,** resíduos 289-292) [11]. A região C-terminal da Bradeiona β contém seqüências de aminoácidos interrompidas por isoleucinas/leucinas a cada sete resíduos, a qual pode formar uma estrutura *coiled-coil* como sugestionado para outras septinas [7,11]. A identidade seqüencial da Bradeiona β com outras septinas humanas são as seguintes: 59% com a SEPT5 (CDCrel-1) [28], 44% com a SEPT2 (*Nedd5*) [29], 41% com a SEPT1(*Diff6*) [30] e 37% com a SEPT7 (CDC10) [31]. Porém, a similaridade seqüencial do domínio GTPase da Bradeiona β com os domínios GTPases das outras septinas de mamíferos é superior a 70%. A região polibásica (próxima ao motivo *P-loop*) também está presente na seqüência primária da Bradeiona β (HRKSVKK, aminoácidos 135-141).

Os 119 aminoácidos iniciais nas proteínas Bradeiona α e β são idênticos, indicando que está região pode ser um domínio em comum entre as duas proteínas. Três aspectos são bastante intrigantes na região N-terminal (comum entre as proteínas Bradeiona α e β): i) a alta porcentagem de resíduos de prolina (14,3%) na seqüência primária [11], ii) o fato de essa região ser uma das mais longas entre todas as septinas de mamíferos e iii) o desconhecimento da função e papel biológico. Após a região idêntica entre as duas proteínas, Bradeiona α possui uma seqüência repetida altamente hidrofóbica: $(CV)_6$ + CL + $(CV)_2$ (ver figura 1.9). A função biológica da septina Bradeiona α ainda é desconhecida e adicionais estudos são necessários.

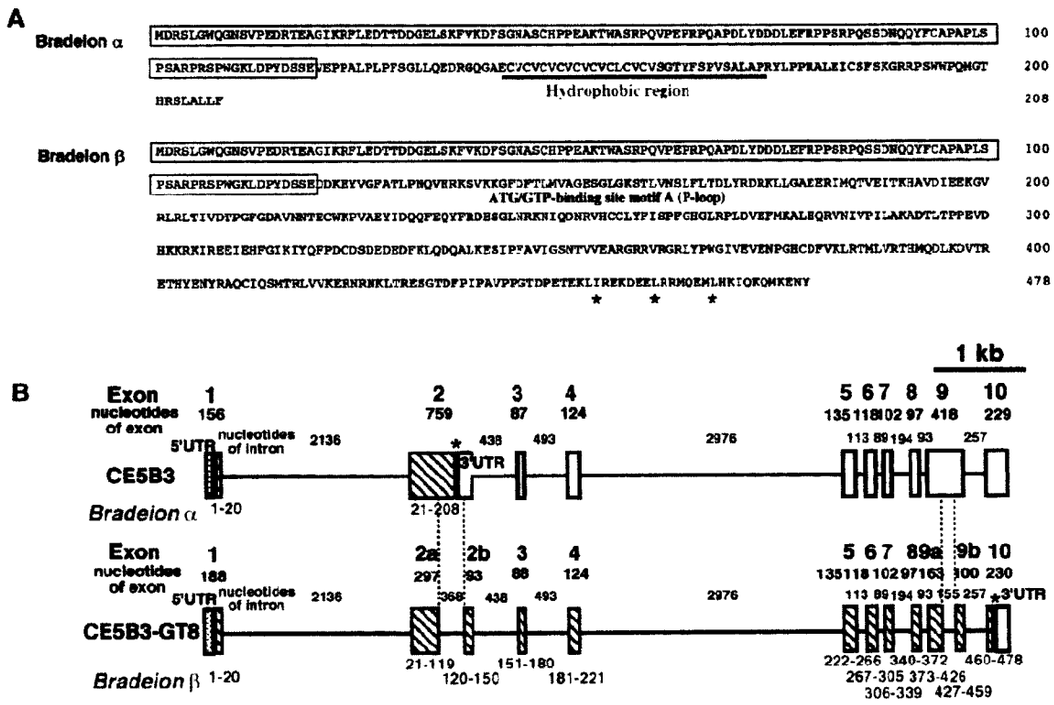


Figura 1.9: Proteínas Bradeiona α e β. (A) Seqüências de aminoácidos das proteínas Bradeiona α e β. Dentro das caixas regiões conservadas entre as duas proteínas (Fragmento conservado). Sublinhado em vermelho região hidrofóbica da Bradeiona α. Em amarelo motivos conservados de ligação a GTP. Os asteriscos indicam seqüências interrompidas por leucinas/isoleucinas (*coiled-coil*). (B) Construção genômica das proteínas Bradeiona α e β. Em vermelho exons (seqüências traduzidas). Figura extraída da referência [11].

Septinas, em muitos casos, são associadas na literatura científica com estados patológicos (doenças). As proteínas SEPT1, SEPT2 e SEPT4(H5), por exemplo, estão relacionadas com patologias neurodegenerativas, como mal de Parkinson e doença de Alzheimer [25]. Interessantemente, em condições de patologia, a proteína SEPT4 (Bradeiona α e β) é detectada somente em câncer do cólon, reto, próstata e melanoma maligno e não observada em outros tipos de câncer como estômago e pulmão [26,27]. Este comportamento nunca foi observado entre outros genes da família septina em mamíferos. Recentemente, M. Tanaka e colaboradores mostraram que a proteína Bradeiona β exerce um essencial papel na proliferação e crescimento de células de câncer colorectal [26,27]. O uso de tratamento do tipo senso-reverso (*antisense*) empregando ribozimas e maxizimas,

demonstrou que as proteínas Bradeiona α e β desempenham papéis críticos em promover a transição da fase G2 para a fase M do ciclo celular [26].

A figura 1.10(A) mostra uma análise por citometria de fluxo para linhagens celulares de carcinoma colorectal (SW480). As células SW480 WT (*wild-type*, linha 1) e as células transfectadas com ribozimas inativas (linha 2) apresentaram o fenótipo da população de células WT em cada fase (G0/G1, S e G2/M), com 70% da população celular na fase G0/G1 (2n) e 15% na fase G2/M (4n) [26]. Células transfectadas com maxizimas inativas apresentaram fenótipo similar, ou seja, com uma população de células normais [26]. Em contraste, células transfectadas com ribozimas específicas para Bradeiona α apresentaram irrelevante atraso na fase S do ciclo celular (fig. 1.10(A), linha 3). O mesmo atraso na fase S foi observado em células transfectadas com ribozimas específicas para a Bradeiona β (fig. 1.10(A), linha 4).

No caso das linhagens celulares transfectadas com ribozimas específicas para Bradeiona α e β, a citometria de fluxo mostrou um pico 8n (8-12% da população celular) com aumento na população celular na fase G2/M (fig. 1.10(A), linhas 5-9, máximo de 68% na linha 9).

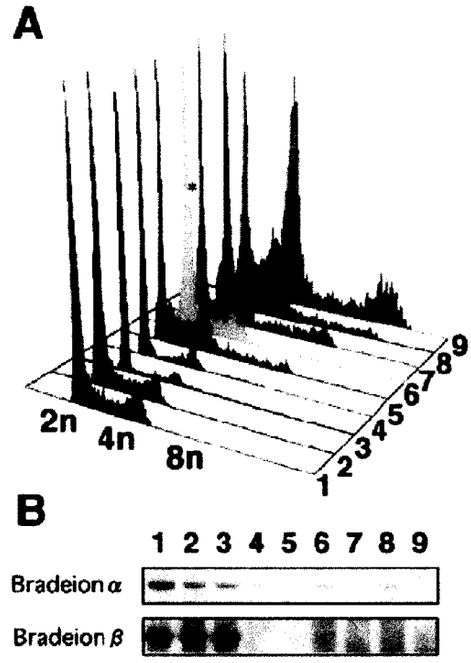


Figura 1.10: **(A)** Estacionamento na fase G2 do ciclo celular em células de carcinoma colorectal (SW480), transfectadas com ribozimas e maxizimas especificas para Bradeiona α e β, observada através de citometria de fluxo. As células foram coradas com *propidium iodide* para mostrar a distribuição do DNA durante o ciclo celular. Dez mil células foram utilizadas na análise. As fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular são indicados por 2n e 4n. **1**. Controle (células SW480). 2. Células SW480 transfectadas com ribozimas inativas. **3**. Células SW480 transfectadas somente com ribozimas específicas para Bradeiona α. **4**. Células SW480 transfectadas somente com ribozimas específicas para Bradeiona β. **5-9**. Células SW480 transfectadas com ribozimas específicas para Bradeiona α e β. (B) Análise por RT-PCR do RNA mensageiro da Bradeiona (α e β) de cada linhagem celular descrita acima. Figura extraída da referência [26].

Para averiguar o nível de RNA mensageiro das Bradeionas α e β foi realizada uma análise através de RT-PCR (veja figura 1.10(B)) [26]. O nível de Bradeiona nas células SW480 transfectadas com ribozimas foi drasticamente menor quando comparada com o controle (células SW480 normais, linha 1) e/ou células SW480 transfectadas com ribozimas inativas (linha 2). O nível de RNA mensageiro da Bradeiona β diminui drasticamente após transfecção com maxizimas (linha 4), contudo nenhuma alteração foi observada em células transfectadas com ribozimas específicas para a Bradeiona α (linha 3). Estes resultados indicam que as ribozimas são altamente especificas para a Bradeiona α.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

As outras linhagens celulares transfectadas com maxizimas não demonstraram expressão significativa da Bradeiona β por RT-PCR (linhas 5-9).

Ribozimas específicas para Bradeiona (α e β) suprimem significativamente o crescimento de tumores em células de camundongos (células de carcinoma colorectal, SW480). Após 60 dias da transfecção com ribozimas específicas para Bradeiona α ou β os tumores diminuíram para 32,4% e 25,9% do volume inicial, respectivamente (em comparação com tumores controle). Transfecção com ambas as ribozimas (α e β) diminuíram o volume do tumor para 4,3% do volume inicial quando comparado com o controle (veja figura 1.11).

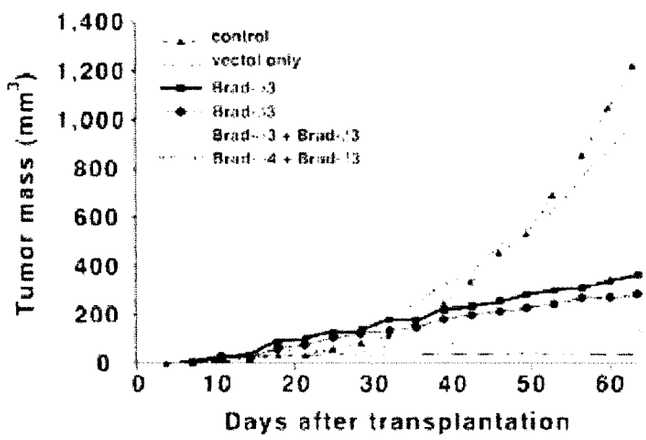


Figura 1.11: Supressão do crescimento de células de carcinoma colorectal (SW480) em camundongos. Ribozimas específicas para Bradeiona (α e β) significativamente suprimem o crescimento de tumores de células SW480. Após 60 dias a transfecção, tumores com ribozimas específicas diminuíram seus volumes (mm^3) para 4,3% do volume inicial quando comparados com controles. O volume do tumor foi determinado com a seguinte relação: $(1/2)x(comprimento)x(largura)^3$. (▲) Controle. (●) e (□) Tumores transfectados com ribozimas especificas para Bradeiona α e β, respectivamente. (○) e (□) Tumores transfectados com ambas as ribozimas especificas (Bradeiona α e β). Figura extraída da referência [26].

Considerando o exposto neste capítulo, septinas são um grupo importante de proteínas envolvidas em vários processos biológicos essenciais. As relações de septinas com vários processos patológicos tornam essas moléculas biológicas alvos de grande interesse para estudos científicos. Neste contexto, no presente trabalho, nos propomos a realizar um estudo estrutural/bioquímico das septinas humanas Bradeiona α e β.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

Capítulo 2

Objetivos

A proposta deste trabalho de doutorado é iniciar a caracterização da septina humana SEPT4 (Bradeiona α e β). Até o dado momento, existem escassas informações reportadas na literatura cientifica sobre septinas de mamíferos. Esforços estão sendo feitos para tentar elucidar a relação entre a atividade GTPase (união e hidrólise do substrato), associação com a membrana, formação de filamentos, redundância dos complexos e o envolvimento de septinas em diversos processos celulares. Espera-se que as informações relatadas neste estudo auxiliem na elucidação dos pontos citados acima.

2.1 Objetivos específicos deste trabalho

O intuito deste projeto é obter o máximo de informação sobre as septinas Bradeiona α e β. Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- Subclonar e expressar o cDNA que codifica a septina Bradeiona β, produzindo a proteína recombinante pura e biologicamente ativa;
- Analisar estruturalmente a septina humana Bradeiona β através de técnicas espectroscópicas e espalhamento dinâmico de luz;
- Confirmar e caracterizar a atividade GTPase da septina Bradeiona β através da técnica de eletroforese capilar;
- Obter cristais da septina humana Bradeiona β através da técnica de difusão de vapor para subseqüente determinação de sua estrutura tridimensional;

- Analisar a estrutura primária da septina Bradeiona β e de outras GTPases por meio de métodos de bioinformática para definir seus domínios estruturais (domínio N-terminal, GTPase e C-terminal);
- Subclonar e expressar os fragmentos de DNA, previamente definidos, que codificam os domínios da septina Bradeiona β (N-terminal e GTPase). Purificar os domínios recombinantes;
- Analisar estruturalmente os domínios da septina Bradeiona β através de técnicas espectroscópicas e espalhamento dinâmico de luz;
- Confirmar e caracterizar a atividade GTPase da fusão GST-Domínio GTPase através da técnica de eletroforese capilar.

No capítulo 3, realizaremos uma abordagem sobre a metodologia utilizada na execução deste trabalho. Descrições sucintas a respeito das técnicas utilizadas de biologia molecular e espectroscopia serão apresentadas. No Capítulo 4, apresentaremos os resultados experimentais obtidos no estudo das septinas Bradeiona α e β. Discussões referentes a septina Bradeiona β e seus domínios isolados serão apresentadas em distintas seções. Finalizando, apresentaremos nossas conclusões a respeito dos resultados experimentais num contexto mais geral. Sugestões de novos caminhos a serem seguidos no estudo de septinas também serão abordadas.

Capítulo 3

Metodologia

Neste capítulo abordaremos as principais técnicas utilizadas no estudo das septinas Bradeiona α e β. Inicialmente, descreveremos detalhadamente a metodologia empregada para a obtenção dos clones utilizados neste trabalho. Em seguida, trataremos da expressão e purificação de cada um dos produtos recombinantes obtidos. As técnicas espectroscópicas empregadas serão discutidas sucintamente no decorrer do capítulo. Abordaremos também as técnicas de espalhamento dinâmico de luz e eletroforese capilar. Finalmente, descrevermos a técnica de cristalização (pelo método de difusão de vapor) empregada nas tentativas de cristalização dos produtos recombinantes.

3.1 Subclonagem

3.1.1 Amplificação e subclonagem do cDNA da Bradeiona β

Oligonucleotídeos foram sintetizados para realizar a amplificação do cDNA da Bradeiona β e posteriormente, a subclonagem em um vetor de expressão bacteriano previamente escolhido. O oligonucleotídeo *forward*, Bradβ/*Bam*HI, foi desenhado com base na extremidade respectiva ao N-terminal5' traduzida do cDNA da Bradeiona β [11], acrescido de um sítio de restrição para a endonuclease *Bam*HI. O oligonucleotídeo *reverse*, Bradβ/*Xho*I, foi desenhado com base na extremidade C-terminal3', acrescido de um sítio de restrição para a endonuclease *Xho*I. Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa Gibco-BRL e estão ilustrados na figura 3.1.

Bradβ/*Bam*HI: 5' CAGGATCCTAATGGACCGTTCACTGGGATG
*Bam*HI

Bradβ/*Xho*I: 3' CCGCTCGAGTTATTTCCTCTGAGTCTCTGG
*Xho*I Stop

Figura 3.1: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do cDNA da Bradeiona β para subseqüente subclonagem no vetor pGEX-5X-1.

O cDNA da proteína Bradeiona β foi amplificado utilizando-se uma reação de polimerização em cadeia (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) em um termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.). Utilizou-se como molde inicial o plasmídeo, gentilmente cedido pela Dra. Manami Tanaka[1], contendo o cDNA da Bradeiona β. A reação de amplificação foi otimizada com relação à concentração de sulfato de magnésio ($MgSO_4$), à temperatura de anelamento e a enzima de polimerização utilizada. A concentração de $MgSO_4$ e a temperatura de anelamento foram variadas com a finalidade de se obter o amplificado mais específico possível. Utilizou-se para a polimerização a enzima Deep Vent polimerase que possui atividade corretiva dos nucleotídeos que incorpora (atividade exonucleásica 3'→5' *proofreading*), reduzindo o risco de mutações. A reação e ciclo de amplificação do cDNA da Bradeiona β estão descritos na Figura 3.2.

Após a amplificação, o produto de PCR foi submetido à filtração para troca de tampão em uma microcoluna descartável Sephacryl-S200 (Amersham-Pharmacia). Aproximadamente 3 μg do produto de PCR foram utilizados na digestão com as endonucleases *Bam*HI e *Xho*I, a 37°C, durante aproximadamente 12 h. Após a digestão foi necessária uma purificação em gel de agarose 0,8% (corado com brometo de etídeo) utilizando-se o *kit* Geneclean (BioRad), para eliminação dos fragmentos gerados na clivagem das extremidades pelas enzimas de restrição. O DNA digerido e purificado foi então quantificado em gel de agarose 0,8% para proceder à ligação.

[1] *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba, Japan.*

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

1,0 μL	oligonucleotídeo Bradβ/*Bam*HI (100 pmol/μL)
1,0 μL	oligonucleotídeo Bradβ/*Xho*I (100 pmol/μL)
2,5 μL	$MgSO_4$ (50mM - Invitrogen)
1,0 μL	dNTP's (10mM - Promega)
5,0 μL	tampão da Deep Vent (10X - NEB)
1,0 μL	Deep Vent (5 unidades/μL) - NEB
38,0 μL	H_2O estéril
0,5 μL	molde (vetor com o cDNA da Bradeiona β ~ 5ng)
50,0 μL	(volume final)

94°C	5'	
94°C	1'	5 vezes (ciclos)
55°C	1'	
94°C	1'	20vezes (ciclos)
60°C	1'	
72°C	10'	
04°C		

Figura 3.2: Reação e ciclo de amplificação (PCR) do cDNA da Bradeiona β. Em azul, etapa de polimerização (extensão) do ciclo de PCR.

Aproximadamente 2 μg do vetor bacteriano pGEX-5X-1 foram linearizados através de uma dupla restrição com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I. O vetor também foi purificado e quantificado em gel de agarose 0,8%. As reações de digestão do cDNA da Bradeiona β e do vetor pGEX-5X-1 estão descritas na figura 3.3.

69,0 μL	cDNA da Bradeiona β (amplificado por PCR, ~ 3,0 μg)
8,0 μL	tampão REact 2 (10X)
1,0 μL	*Bam*HI (10 unidades/μL) – Gibco-BRL
1,0 μL	*Xho*I (10 unidades/μL) – Gibco-BRL
1,0 μL	H_2O estéril
80,0 μL	(volume final)

10,0 μL	vetor pGEX-5X-1 (~ 2μg)
1,5 μL	tampão REact 2 (10x)
1,0 μL	*Bam*HI (10 unidades/μL)
1,0 μL	*Xho*I (10 unidades/μL)
1,5 μL	H_2O estéril
15,0 μL	(volume final)

Figura 3.3: Reações de digestão do produto de PCR e do vetor pGE-5X-1.

Após amplificação e purificação, realizamos uma mistura de ligação contendo o cDNA amplificado e o vetor pGEX-5X-1 linearizado. A mistura foi realizada na razão molar aproximada de 4:1 (cDNA:vetor bacteriano) na presença da enzima T4 DNA ligase e incubada durante 2 h a 16°C e 12 h a 8°C (veja figura 3.4). Todo o volume da mistura de ligação foi utilizado na transformação de células de *E. coli* DH5α (Invitrogen), competentes por tratamento com cloreto de cálcio ($CaCl_2$) [32]. Os transformantes foram selecionados em meio LB contendo 100 μg/mL de ampicilina.

10,0 μL	vetor pGEX-5X-1, ~ 100 ng (digerido em *Xho*I e *Bam*HI)
5,0 μL	cDNA da Bradeiona β, ~ 100 ng (digerido em *Xho*I e *Bam*HI)
4,0 μL	tampão da T4 DNA ligase (5X) - Promega
1,0 μL	T4 DNA ligase (3,0 unidades/μL) - Promega
20,0 μL	(volume final)

Figura 3.4: Mistura de ligação do cDNA da Bradeiona β e o vetor pGEX-5X-1.

As colônias resistentes foram crescidas em 5 mL de meio de cultura LB (Luria-Bertani) contendo 100 μg/mL de ampicilina para a extração do DNA plasmidial por lise alcalina [32]. As colônias recombinantes foram confirmadas por análise de restrição do DNA plasmidial com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I, observada em eletroforese em gel de agarose (0,8% TAE) corado com brometo de etídeo. Os clones obtidos foram seqüenciados em um seqüenciador automático da Perkin Elmer (AB1-Prism-377) pelo método do didesoxinucleotídeo marcado [33], utilizando-se de oligonucleotídeos sintetizados especialmente para anelar no vetor pGEX-5X-1. Em virtude do cDNA da Bradeiona β ser relativamente extenso, ~1.500 pares de bases (pb), foi necessário desenhar dois novos oligonucleotídeos que hibridizariam em regiões internas do fragmento com a finalidade de sequenciar a totalidade do cDNA. O sequenciamento confirmou a subclonagem do cDNA, dentro do correto quadro de leitura do vetor e um dos clones positivos foi selecionado para testes de expressão. O vetor de expressão resultante desta construção foi denominado **pGEX-Bradβ**. O vetor de expressão bacteriano escolhido, permite a expressão da proteína

de interesse fusionada a proteína carreadora GST (Glutationa S-Transferase, ~27 kDa), além de um sítio de reconhecimento para a protease Fator Xa.

A região de interface entre a proteína Bradeiona β e a GST está ilustrada na figura 3.5, onde podemos verificar que após a clivagem da proteína de fusão restarão ainda três aminoácidos adicionais (em verde) na Bradeiona β. O mapa do plasmídeo pGEX-5X-1 e detalhes da região de subclonagem podem ser observados no apêndice A.

T F G G G D H P P K S D L I E G R G I L M D R S L G W Q G N S V P
GST Fator Xa Bradeiona β

Figura 3.5: Seqüência de aminoácidos na região de interface entre a proteína GST e a Bradeiona β. Em preto: seqüência de aminoácidos da região C-terminal da GST. Em marrom: sítio de clivagem da protease Fator Xa. Em azul: seqüência de aminoácidos da região N-terminal da Bradeiona β. Em verde: aminoácidos adicionais restantes após clivagem.

3.1.2 Amplificação e subclonagem da região que codifica o Fragmento Conservado (FC)

O Fragmento Conservado (FC) representa os 119 aminoácidos inicias idênticos entre as proteínas Bradeiona α e β (ver figura 1.10). Desse modo, acreditamos que está região pode ser um domínio em comum entre as proteínas Bradeiona α e β [11]. Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram desenhados para realizar a amplificação da região que codifica o FC. Posteriormente, esse fragmento foi subclonado nos vetores de expressão bacterianos pGEX-5X-1 e pET28a(+). Para subclonagem no vetor pGEX-5X-1, o oligonucleotídeo *sense* (Bradβ/*Bam*HI) foi o mesmo utilizado na amplificação do cDNA da Bradeiona β. O oligonucleotídeo *reverse*, BradFC/*Xho*I, foi desenhado com base no término da região idêntica entre as proteínas Bradeiona α e β, acrescido de um sítio de restrição para a endonuclease *Xho*I. Os oligonucleotídeos, sintetizados pela Gibco-BRL, estão ilustrados na figura 3.6.

Bradβ/*Bam*HI: 5' CAGGATCCTAATGGACCGTTCACTGGGATG
*Bam*HI

BradFC/*Xho*I : 3' CCGCTCGAGTTACTCAGAGGAATCATAGGG
*Xho*I stop

Figura 3.6: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação da região que codifica o FC para posterior subclonagem no vetor de expressão bacteriano pGEX-5X-1.

Os oligonucleotídeos desenhados para realizar a amplificação da região que codifica o FC e posteriormente, a subclonagem no vetor de expressão pET28a(+) estão ilustrados na figura 3.7.

FC-SENSE/*Nde*I – GGAATTCCATATGGACCGTTCACTGGGATG
*Nde*I

FC-REVER/*Xho*I – CCGCTCGAGTTAAAAAAGCAGTGCCAG
*Xho*I Stop

Figura 3.7: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação da região que codifica o FC para posterior subclonagem no vetor de expressão bacteriano pET28a(+).

Em ambos os casos, as amplificações foram realizadas utilizando-se uma reação de polimerização em cadeia em um termociclador PTC-100, tendo como molde inicial o plasmídeo contendo o cDNA da Bradeiona β. Nas reações de PCR, optou-se pela utilização da enzima Pfx DNA polimerse, uma enzima que possui a capacidade de correção dos nucleotídeos que incorpora. As reações de amplificação e ciclo de PCR estão descritos na figura 3.8. Após a amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à filtração para troca de tampão em microcolunas descartáveis Sephacryl-S200. Aproximadamente 2 μg do produto amplificado para subclonagem no vetor pGEX-5X-1 foram utilizados na digestão com as endonucleases *Bam*HI e *Xho*I, a 37°C, durante aproximadamente 12 h. Para subclonagem no vetor pET28a(+), aproximadamente 4 μg do amplificado foram utilizados na digestão com as endonucleases *Nde*I e *Xho*I, a 37°C, durante aproximadamente 12 h.

1,0 µL	oligonucleotídeo Bradβ/*BamH*I ou FC-SENSE/*Nde*I (100 pmol/µL)
1,0 µL	oligonucleotídeo BradFC/*Xho*I ou FC-REVER/*Xho*I (100 pmol/µL)
2,5 µL	$MgSO_4$ (50mM - Invitrogen)
1,0 µL	dNTP's (10mM - Promega)
5,0 µL	tampão da Pfx polimerase (10X) - Invitrogen
1,0 µL	Pfx DNA polimerase (5 unidades/µL) - Invitrogen
38,0 µL	H_2O estéril
0,5 µL	molde (vetor com cDNA da Bradeiona β ~ 5ng)
50,0 µL	(volume final)

94°C	5'	
94°C	30''	25 vezes (ciclos)
62°C	30''	
72°C	**30''**	
72°C	**10'**	
04°C		

Figura 3.8: Reações de amplificação e ciclo de PCR da região que codifica o FC (para subclonagem nos vetores pGEX-5X-1 e pET28a). O ciclo de PCR foi o mesmo nos dois casos. Em azul, etapa de extensão no ciclo de PCR.

Após a digestão, realizamos uma purificação em gel de agarose 0,8% utilizando o *kit* Geneclean. Os produtos amplificados, digeridos e purificados foram então quantificados em gel de agarose 0,8% para proceder à ligação. Os vetores bacterianos pGEX-5X-1 e pET28a(+) foram linearizados através de uma dupla restrição com as respectivas enzimas empregadas acima. Todas as reações de digestão estão descritas na figura 3.9.

69,0 µL	produto de PCR (~ 2,0 µg ou ~ 4,0 µg)
8,0 µL	tampão REact 2 (10x)
1,0 µL	*Bam*HI ou *Nde*I (10 unidades/µL)
1,0 µL	*Xho*I (10 unidades/µL)
1,0 µL	H_2O estéril
80,0 µL	(volume final)

10,0 µL	vetor pGEX-5X-1 ou pTE28a(+) (~ 2µg)
1,5 µL	tampão REact 2 (10x)
1,0 µL	*Bam*HI ou *Nde*I (10 unidades/µL)
1,0 µL	*Xho*I (10 unidades/µL)
1,5 µL	H_2O estéril
15,0 µL	(volume final)

Figura 3.9: Reações de digestão dos produtos de PCR (região que codifica o FC) e vetores de expressão bacterianos.

IFSC-USP SERVIÇO DE

Realizamos, em ambos os casos, uma mistura de ligação contendo o fragmento que codifica o FC e o vetor bacteriano linearizado na razão molar aproximada de 8:1 (inserto:vetor) na presença da enzima T4 DNA ligase, incubando a reação durante 2 h a 16°C e 12 h a 8°C (veja figura 3.10). Todo o volume das misturas de ligação foram utilizados em transformações de células de *E. coli* DH5α, competentes por tratamento com $CaCl_2$ [32]. Os transformantes foram selecionados em meio LB contendo 100 μg/mL de ampicilina ou 50 μg/mL de canamicina, dependendo do vetor de expressão utilizado.

10,0 μL	vetor pGEX-5X-1 ou pET28a(+) (~ 100 ng/μL)
5,0 μL	produto de PCR, ~ 100 ng/μL (*Bam*HI/*Xho*I ou NdeI/*Xho*I)
4,0 μL	tampão da T4 DNA ligase (5X)
1,0 μL	T4 DNA ligase (3,0 unidades/μL)
20,0 μL	(volume final)

Figura 3.10: Reação de ligação da região que codifica o FC nos vetores pGEX-5X-1 e pET28a(+).

Os clones positivos foram confirmados através da técnica de PCR de colônia. Um total de 16 colônias isoladas dos transformantes foram puncionadas e tiveram suas células assepticamente ressuspensas em 50 μL de água MilliQ estéril. Estas suspensões bacterianas foram então aquecidas a 100°C por 5 mim e centrifugadas durante 5 min a 13.000xg. Alíquotas de 5 μL foram individualmente retiradas do sobrenadante e submetidas à PCR sob o mesmo ciclo utilizado para amplificar a região codificante do FC, sendo posteriormente analisadas em eletroforese em gel de agarose (0,8% TAE).

Os clones verificados positivos pela técnica de PCR de colônia foram crescidos em 5 mL de LB contendo 100 μg/mL de ampicilina ou 50 μg/mL de canamicina, para a extração do DNA plasmidial por lise alcalina [32]. Após a extração, cada clone foi seqüenciado em um seqüenciador automático da Perkin Elmer [33]. No caso do vetor pET28a(+), utilizaram-se os oligonucleotídeos T7 promoter e T7 terminator. Estes oligonucleotídeos comerciais hibridizam em regiões do promotor e terminador de

transcrição da RNA polimerase do bacteriófago T7, presentes no vetor de expressão pET28a(+).

O sequenciamento confirmou a subclonagem dos insertos dentro do correto quadro de leitura dos vetores. Os vetores de expressão resultantes destas construções foram denominados **pGEX-BradFC** e **pET28-FC**. O vetor de expressão bacteriano pET28a(+) permite a expressão da proteína de interesse com uma cauda N-terminal, contendo seis histidinas (6xHis), e um sítio de reconhecimento para a protease Trombina. A presença desta cauda confere a proteína de fusão alta afinidade para interação em resinas cromatográficas contendo íons metálicos. A região de interface entre o FC e a GST (pGEX-BradFC) é idêntica a ilustrada na figura 3.5. A região de interface na construção utilizando o vetor bacteriano pET28a(+) está ilustrada na figura 3.11. O mapa do plasmídeo pET28a(+) e detalhes da região de subclonagem podem ser observados no apêndice A.

H H H H H H S S G L V P R G S H M D R S L G W Q G N S V P
6xHis Trombina Fragmento conservado

Figura 3.11: Seqüência de aminoácidos na região de interface entre a cauda com histidinas (6xHis) e o FC. Em preto: seis histidinas (6xHis). Em marrom: sítio de clivagem para a protease Trombina. Em azul: seqüência de aminoácidos N-terminal do Fragmento conservado. Sublinhados, aminoácidos restantes após clivagem.

3.1.3 Amplificação e subclonagem da região que codifica o Domínio GTPase (DGTPase)

Estruturas tridimensionais de septinas são ausentes na literatura científica. Desse modo, não sabíamos precisamente onde iniciava e terminava cada domínio estrutural da septina Bradeiona β. Com o intuito de definir estes limites, realizamos um estudo das estruturas primárias das septinas de humanos conhecidas e de pequenas GTPases. Os critério utilizados na definição do domínio GTPase serão discutidos em seus pormenores no capítulo 4. Assim, oligonucleotídeos foram desenhados para amplificar dois diferentes

possíveis limites da região que codifica o domínio GTPase (DGTPase) e posteriormente, suas subclonagens nos vetores de expressão bacteriano pGEX-5X-1 e pET28a(+). Os oligonucleotídeos sintetizados pela Gibco-BRL estão ilustrados na figura 3.12.

pET-*Nde*I/DOM1*sense*: GGAATTCCATATGTATGTGGGCTTTGCAACCCTC (A1)
NdeI

pET-*BamHI*/DOM1r: CGGGATCCTCACCGGTAGTTCTCATAATGTGTCTCCC (A2)
BamHI stop

pGEX- *BamHI* /DOM1*sense*: CGGGATCCTGTATGTGGGCTTTGCAACC (B1)
BamHI

pGEX- *Xho*I/DOM1rev: CCGCTCGAGTTAGCGGTAGTTCTCATAATG (B2)
XhoI stop

pET-*Nde*I/DOM2sense: GGAATTCCATATGGACTTTACCCTCATGGTGGCA (C1)
*Nde*I

pET-*Bam*HI/DOM2rev: CGGGATCCTCAGGTCATGCTCTGGATGCACTGT (C2)
*Bam*HI stop

pGEX- *BamHI* /DOM2sense: CGGGATCCTGGACTTTACCCTCATGGTGGCA (D1)
BamHI

pGEX- *Xho*I/DOM2rev: CCGCTCGAGTTAGTCATGCTCTGGATGCACTGT (D2)
XhoI stop

Figura 3.12: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação de dois possíveis limites do DGTPase para posterior subclonagem nos vetores de expressão pGEX-5X-1 e pET28a(+). A1 e A2. Oligonucleotídeos para subclonagem da primeira definição do DGTPase (124-408) no vetor pET28a. B1 e B2. Oligonucleotídeos para subclonagem da primeira definição do DGTPase (124-408) no vetor pGEX-5X-1. C1 e C2. Oligonucleotídeos para subclonagem da segunda definição do DGTPase (144-416) no vetor pET28a(+). D1 e D2. Oligonucleotídeos para subclonagem da segunda definição do DGTPase (144-416) no vetor pGEX-5X-1.

Utilizando os oligonucleotídeos descritos acima, dois diferentes supostos limites da região codificante do DGTPase (aminoácidos 124-408 e 144-416, respectivamente) foram amplificados utilizando-se uma reação de polimerização em cadeia, tendo como molde inicial o plasmídeo contendo o cDNA da Bradeiona β. Em todos os casos a metodologia empregada foi à mesma. Nas reações de PCR, utilizou-se para a polimerização a enzima

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

empregada foi à mesma. Nas reações de PCR, utilizou-se para a polimerização a enzima Taq Platinum. As reações de amplificação e ciclo de PCR estão descritos na figura 3.13.

1,0 μL	oligonucleotídeo *sense* (A1, B1, C1 ou D1, 100 pmol/μL)
1,0 μL	oligonucleotídeo *reverse* (A2, B2, C2 ou D2, 100 pmol/μL)
2,5 μL	$MgSO_4$ (50mM - Invitrogen)
1,0 μL	dNTP's (10mM - Promega)
5,0 μL	tampão da Taq Platinum (10X)
1,0 μL	Taq Platinum (5 unidades/μL)
38,0 μL	H_2O estéril
0,5 μL	molde (vetor com cDNA da Bradeiona β ~ 5ng)
50,0 μL	(volume final)

94°C	5'	
94°C	30''	25 vezes (ciclos)
62°C	1'	25 vezes (ciclos)
72°C	1'30''	25 vezes (ciclos)
72°C	10'	
04°C		

Figura 3.13: Reação e ciclo de amplificação (PCR) da região codificante do domínio GTPase. Dois distintos limites do domínio GTPase (aminoácidos 124-408 e 144-416) para subclonagem nos vetores pGEX-5X-1 e pET28a(+).

Aproximadamente 2 μg de cada produto amplificado foram utilizados na digestão com as endonucleases apropriadas (veja figura 3.12) a 37°C, durante 12 h para subclonagem nos vetores pGEX-5X-1 e pET28a(+). As reações de digestão são similares a reações descritas na figura 3.9. Após as digestões, foram realizadas purificações em gel de agarose 0,8% utilizando-se o *kit* Geneclean. Em todos os casos, realizamos uma mistura de ligação contendo o inserto do DGTPase e os vetores pGEX-5X-1 e pET28a(+) linearizados (similar a figura 3.9) na razão molar aproximada de 5:1 (inserto:vetor bacteriano) na presença da enzima T4 DNA ligase e incubadas durante 2 h a 16°C e 12 h a 4°C (similar a figura 3.10). Todo o volume das misturas de ligação, em cada caso, foram utilizados em transformações de células de *E. coli* DH5α, competentes por tratamento com $CaCl_2$ [32]. Os transformantes foram selecionados em meio LB, contendo 100 μg/mL de ampicilina ou 50 μg/mL de canamicina dependendo do vetor utilizado. Os clones obtidos de cada

construção foram confirmados através da técnica de PCR de colônia, como descrito na subseção 3.1.2. Os clones verificados positivos foram crescidos em 5 mL de meio LB contendo 100 μg/mL de ampicilina ou 50 μg/mL de canamicina, dependendo do vetor utilizado, para a extração do DNA plasmidial por lise alcalina [32]. Após a extração, cada clone foi seqüenciado em um seqüenciador automático [33]. Em todos os casos, confirmou-se a subclonagem dos insertos dentro do correto quadro de leitura dos vetores. Os vetores de expressão resultantes destas construções foram denominados **pGEX-DOM1**, **pET28-DOM1**, **pGEX-DOM2** e **pET28-DOM2**.

As regiões de interface nas quatro construções elaboradas estão ilustradas na figura 3.14.

H H H H H H S S G L V P R G S H M Y V G F A T L (1)

T F G G G D H P P K S D L I E G R G I L Y V G F A T (2)

H H H H H H S S G L V P R G S H M D F T L M V A (3)

T F G G G D H P P K S D L I E G R G I L D F T L M V A (4)

Figura 3.14: Seqüência de aminoácidos na região de interface em cada construção elaborada. (1) Interface entre a cauda com histidinas e a primeira definição do DGTPase (124-408). (2) Interface entre a GST e a primeira definição do DGTPase. (3) Interface entre a cauda com histidinas e a segunda definição do DGTPase (144-416). (4) Interface entre a GST e a segunda definição do DGTPase. Em verde, seis histidinas (6xHis). Em azul, seqüência do produto de interesse. Em laranja, região de reconhecimento da protease Trombina. Em marrom, região de reconhecimento da protease Fator Xa. Os aminoácidos restantes após clivagem, em cada construção, estão sublinhados.

3.1.4 Amplificação e subclonagem do cDNA da Bradeiona α

Oligonucleotídeos foram desenhados para realizar a amplificação do cDNA da Bradeiona α e posteriormente, a subclonagem no vetor de expressão bacteriano pGEX-5X-1. Os oligonucleotídeos, sintetizados pela empresa Gibco-BRL, estão ilustrados na figura 3.15. O cDNA da Bradeiona α foi amplificado utilizando-se uma reação de polimerização

em cadeia (PCR). Utilizou-se como molde inicial o plasmídeo, cedido pela Dra. M. Tanaka, contendo o cDNA da Bradeiona α [11].

Bradα/*Bam*HI : 5' CAGGATCCTAATGGACCGTTCACTGGGATG 3'
*Bam*HI

Bradα /*Xho*I : 5' CCGCTCGAGTTAAAAAAGCAGTGCCAG 3'
*Xho*I stop

Figura 3.15: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do cDNA da Bradeiona α e subseqüente subclonagem no vetor pGEX-5X-1.

Na reação de PCR, utilizou-se para a polimerização a enzima Pfx DNA polimerase. O ciclo de amplificação utilizando está descrito na figura 3.16.

1,0 μL	oligonucleotídeo Bradβ/*Bam*HI (100 pmol/μL)
1,0 μL	oligonucleotídeo Bradα/*Xho*I (100 pmol/μL)
2,5 μL	$MgSO_4$ (50mM - Invitrogen)
1,0 μL	dNTP's (10mM - Promega)
5,0 μL	tampão da Pfx DNA polimerase (10X)
1,0 μL	Pfx DNA polimerase (5 unidades/μL) - NEB
38,0 μL	H_2O estéril
0,5 μL	molde (vetor com cDNA da Bradeiona α ~ 5ng)
50,0 μL	(volume final)

94°C	5'	
94°C	1'	5 vezes (ciclos)
50°C	1'	
72°C	1'	
94°C	1'	20vezes (ciclos)
55°C	1'	
72°C	1'	
72°C	10'	
04°C		

Figura 3.16: Reação e ciclo de amplificação (PCR) do cDNA da Bradeiona α. Em azul, etapa de extensão no ciclo de PCR.

Aproximadamente 4 μg do produto de PCR foram utilizados na digestão com as endonucleases *BamH*I e *Xho*I, a 37°C, durante aproximadamente 12 h (similarmente a figura 3.9). Após a amplificação e a purificação, realizamos uma mistura de ligação contendo o gene da Bradeiona α e o vetor pGEX-5X-1 linearizado. A mistura foi realizada

na razão molar aproximada de 6:1 na presença da enzima T4 DNA ligase e incubada durante 2 h a 16°C e 16 h a 4°C (similarmente a figura 3.10). Todo o volume da mistura de ligação foi utilizado na transformação de células de *E.*coli DH5-α [32]. Os transformantes foram selecionados em meio LB contendo 100 μg/mL de ampicilina.

Um total de 9 transformantes foram crescidos em 5 mL de meio LB contendo 100 μg/mL de ampicilina para extração do DNA plasmidial, utilizando *o kit* Miniprep (Qiagem). Após a extração, cada clone foi submetido a uma análise de restrição com as endonucleases *BamH*I e *Xho*I e analisada em gel de agarose (0,8% TAE). Os clones verificados positivos na análise de restrição foram seqüenciados [33], confirmando-se a subclonagem do gene da Bradeiona α dentro do correto quadro de leitura do vetor. O vetor de expressão resultante desta construção foi denominado **pGEX-Bradα**. Como os 119 aminoácidos inicias das septinas Bradeiona α e β são idênticos, a interface entre a proteína carreadora GST e a Bradeiona α é idêntica a interface ilustra na figura 3.5.

Na tabela 3.1, estão listados todos os plasmídeos e linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho.

Plasmídeos	Produto expresso	Aminoácidos	Linhagens
pProEx-Bradβ	6xHis+Bradeiona β	1 - 478	BL21(DE3), AD494
pProEx-Bradα	6xHis+Bradeiona α	1 - 208	BL21(DE3), AD494
pGEX-Bradβ	GST+Bradeiona β	1 - 478	AD202
pGEX-BradFC	GST+FC	1 - 119	AD202
pET28-FC	6xHis+FC	1 - 119	BL21(DE3)
pGEX-DOM1	GST+DGTPase (1)	124 - 408	AD202
pET28-DOM1	6xHis+DGTPase (1)	124 - 408	AD494, ORIGAMI
pGEX-DOM2	GST+DGTPase (2)	144 - 416	AD202, ORIGAMI
pET28-DOM2	6xHis+DGTPase (2)	144 - 416	ER2566
pGEX-Bradα	GST+Bradeiona α	1 - 208	AD202

Tabela 3.1: Plasmídeos e linhagens bacterianas utilizadas para expressão heteróloga. A linhagem **DH5α** foi utilizada sempre quando necessária uma propagação plasmideal. A terceira coluna indica o primeiro e último aminoácido do produto de interesse considerando-se a seqüência primária completa da Bradeiona β (não se considera a seqüência primária da proteína carreadora GST ou da cauda com histidinas). (1) e (2) indicam dois limites diferentes escolhidos para o domínio GTPase. Os dois primeiros plamídeos da tabela (cedidos pela Dr. M. Tanaka) foram utilizados de moldes iniciais na elaboração dos outros sistemas de expressão citados.

3.2 Expressão e purificação

3.2.1 Expressão e purificação da proteína recombinante Bradeiona β

Células de *E. coli* AD202 (Novagen) competentes por tratamento com $CaCl_2$ foram transformadas com DNA plasmidial purificado dos clones positivos obtidos (**pGEX-Bradβ**). A linhagem bacteriana AD202 possui resistência ao antibiótico canamicina, ou seja, é necessário utilizar um vetor de expressão que confira resistência a outro antibiótico. Uma colônia isolada da placa dos transformantes foi individualmente inoculada em 10 mL de meio LB acrescido de ampicilina (100 μg/mL) e canamicina (50 μg/mL) e incubada sob agitação (250 rpm) a 37°C durante 12 h. A seguir, inoculou-se 5 mL da cultura anterior em um frasco com 500 mL de meio LB, acrescido de ampicilina (100 μg/mL) e canamicina (50 μg/mL), que foi incubado sob agitação a 37°C até atingir densidade óptica de $D.O._{600nm} \approx 0,8$. Após a proliferação celular foi retirada uma alíquota de 200 μL, representado a cultura antes da indução.

A cultura foi então induzida com 0,2 mM de IPTG (em concentração final) e novamente incubada a 20°C sob agitação. Amostras de 200 μL foram retiradas transcorridos os tempos de indução de 2h (t_1), 4h (t_2), 6h (t_3), 8h (t_4) e 10h (t_5). Todas as amostras foram centrifugadas por 1 min, sob velocidade máxima em microcentrífuga (Eppendorf 5415D), tiveram seus sobrenadantes descartados e os precipitados foram ressuspensos em 40 μL de água MilliQ. Adicionou-se 20 μL de tampão da amostra contendo β-mercaptoetanol, fervendo 5 min em seguida. Um total de 10 μL de cada uma das amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE 15%) segundo o método de Laemmli [34]. Os marcadores de massa molecular

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

utilizados foram: Albumina sérica bovina (66 kDa), Ovalbumina (45 kDa), Anidrase Carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20 kDa) e Citocromo c (12,4 kDa).

Após a indução a 20°C, as células referentes a 500 mL de cultura foram centrifugadas a 6.000xg (4°C) e o precipitado ressuspenso em 20 mL de tampão contendo 100 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl, 1 mM de PMSF (Phenylmethylsufonyl Fluoride), 1 μM Leupeptina, 10 μM Pepstatina A, 10 mM EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), pH 8,0. Em seguida, acrescentou-se Lisozima (0,5 mg/mL) deixando a mistura em gelo durante aproximadamente 30 mim. A Lisozima age sob a parede celular da bactéria desestruturando a mesma. Em seguida, utilizou-se ultra-som (sonicação) para romper definitivamente as células. Sonicou-se a mistura 8 vezes durante 15 s cada (média potência), com intervalo de 30 s (em gelo). Após a lise, a mistura foi submetida a uma nova centrifugação a 30.000xg (4°C) e o precipitado foi separado do sobrenadante. O sobrenadante foi então filtrado e aplicado em uma coluna com 2 mL da resina Glutathione Sepharose 4B (Amersham Pharmacia), previamente equilibrada no tampão A (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0). Após a passagem do sobrenadante, lavou-se a resina com 20 mL do tampão A (10 volumes).

Em seguida, foi realizado uma eluição da proteína de fusão com um tampão contendo 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1mM $CaCl_2$, pH 8,0 e 10 mM de Glutationa reduzida (GSH). O cloreto de cálcio foi adicionado à solução tampão para aumentar a eficiência da protease Fator Xa que será utilizada na clivagem da proteína de fusão. A GSH possui alta afinidade pela proteína GST, o que provoca o desligamento da proteína de fusão da matriz. As eluições foram coletada em frações de 1 mL e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE 15%).

Após a eluição da proteína de fusão, realizou-se testes de clivagem com a protease Fator Xa para verificar a eficiência da separação da Bradeiona β da GST. A concentração da proteína de fusão foi estimada utilizando-se absorbância no comprimento de onda λ =

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

280 nm e o coeficiente de extinção molar ε calculado teoricamente [35]. Acrescentou-se 2 unidades de Fator Xa (cada unidade cliva aproximadamente 100 μg de proteína de fusão segundo o manual do fabricante) a uma amostra contendo aproximadamente 500 μg de proteína de fusão [36]. A amostra foi mantida a temperatura estável de 12°C e retiraram-se alíquotas em intervalos de tempos bem determinados. Determinou-se que 1 unidade da protease Fator Xa clivava 250 μg de proteína de fusão (em solução) em aproximadamente 4 h à temperatura estável de 12°C.

Porém, para facilitar a purificação realizamos a clivagem da proteína de fusão ainda ligada à resina de afinidade, sob agitação suave, e nas mesmas condições otimizadas anteriormente para a proteína de fusão em solução. Desse modo, não tivemos que passar pela etapa de purificação da GST, pois a mesma ficou integralmente ligada a resina de afinidade após a clivagem. Depois da clivagem na resina durante aproximadamente 4 h, a matriz foi lavada com 8 mL de solução tampão, 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1mM PMSF, pH 8,0, e a eluição coletada em frações de 1 mL. O inibidor de serina protease PMSF foi adicionado para inibir a atividade da protease Fator Xa após lavagem.

Uma alíquota da lavagem da resina após clivagem foi retirada e submetida à análise por eletroforese (SDS-PAGE 15%). Em seguida, as lavagens foram reunidas, concentradas e aplicadas na coluna de cromatografia de exclusão molecular Superdex-200 (Amersham-Pharmacia) utilizando o sistema Äkta Explorer-10 (Amersham-Pharmacia). O fluxo utilizado foi de 0,5 mL/mim, monitorado pela absorbância em λ = 280 nm e o eluído coletado em frações de 0,5 mL. As frações eluídas da Superdex-200, contendo proteína, foram preparadas e submetidas à análise através de eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 15%). As frações com proteína Bradeiona β, verificadas através de gel desnaturante, foram reunidas e dialisadas (membrana com corte de 12-14 kDa) contra o tampão composto de 50 mM MES, 100 mM NaCl, pH 6,5 para precipitação de subprodutos da Bradeiona β. Após precipitação e retirada dos subprodutos por centrifugação (12.000xg durante 15 min, 4°C),

a proteína Bradeiona β foi novamente dialisada contra o tampão A para futura caracterização.

3.2.2 Expressão e purificação do Fragmento Conservado (FC) recombinante

Para expressão e purificação do Fragmento Conservado (FC) utilizando o vetor bacteriano pGEX-5X-1, optamos em utilizar aproximadamente as mesmas condições experimentais definidas para a proteína Bradeiona β. Assim, células de *E. coli* AD202 competentes foram transformadas por choque térmico com DNA plasmidial purificado do clone positivo selecionado (**pGEX-BradFC**). Uma colônia isolada foi individualmente inoculada em 10 mL de meio LB acrescido de ampicilina (100 μg/mL) e canamicina (50 μg/mL), e incubada sob agitação (250 rpm) a 37°C durante 12 h. A seguir, inoculou-se 5 mL da cultura anterior em um frasco com 500 mL de meio LB que foi incubado sob agitação a 37°C até atingir $D.O._{600nm} \approx 0,7$. Uma alíquota de 200 μL foi retirada nesta etapa, representando a cultura antes da indução.

Em seguida, a cultura foi induzida com 0,4 mM de IPTG (em concentração final) e o frasco incubado novamente a 20°C sob agitação. Amostras de 200 μL foram retiradas transcorridos os tempos de indução de 2h (t_1), 4h (t_2), 6h (t_3) e 8h (t_4). Todas as amostras foram preparadas como descrito anteriormente e submetidas à análise por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 15%). Após a indução, as células referentes a 500 mL de cultura foram centrifugadas a 6.000xg (4°C) e o precipitado ressuspenso em 20 mL de tampão A. Em seguida, acrescentou-se Lisozima (0,5 mg/mL) e incubou-se a mistura em gelo durante 30 min. A mistura foi sonicada 8 vezes durante 30 s cada, com intervalo de 30 s (em gelo). Após a lise, a mistura foi submetida a uma nova centrifugação à 30.000xg (Sorvall, 4°C) e o precipitado foi separado do sobrenadante. O sobrenadante foi então filtrado e aplicado em uma coluna com 2 mL da resina Glutathione Sepharose 4B pré-equilibrada com o

tampão A. Após a passagem do sobrenadante, lavou-se a resina com 20 mL do tampão A (10 volumes). Novamente, optou-se pela clivagem da proteína de fusão ainda ligada a resina, nas mesmas condições utilizadas para a Bradeiona β. A interface entre a proteína carreadora (GST) e as proteínas de interesse são idênticas nas duas construções, resultando que o FC também possuirá três aminoácidos adicionais em seu N-terminal após clivagem.

Após clivagem na resina, a mesma foi empacotada e lavada com 8 mL de solução tampão (4 volumes) contendo 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1mM PMSF, pH 8,0 e coletada em frações de 1 mL. Uma alíquota da lavagem da resina após clivagem foi retirada e preparada para análise por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 15%). Em seguida, as lavagens foram reunidas, concentradas e aplicadas na coluna de exclusão molecular Superdex-75 preparativa (Amersham-Pharmacia), usando o sistema Äkta Explorer-10. O fluxo utilizado na gel filtração foi de 0,5 mL/mim, monitorado pela absorbância em $\lambda = 280$ nm e o eluido coletado em frações de 0,5 mL. As frações eluídas em tampão A da Superdex-75, contendo FC recombinante, foram preparadas para análise por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 15%).

Para expressão e purificação do FC utilizando o vetor pET28a(+), células de *E.* coli BL21(DE3) competentes por tratamento com $CaCl_2$, foram transformadas por choque térmico com DNA plasmidial purificado do clone positivo selecionado (**pET28-FC**). Foi utilizado 5 mL de uma cultura *overnight* para inocular 500 mL de meio LB acrescido de canamicina (50 μg/mL) e incubado sob agitação a 37°C até atingir $D.O._{600nm} = 0.5$. Após a proliferação celular foi retirada uma alíquota de 200 μL representado a cultura antes da indução. A cultura foi então induzida com 0,5 mM de IPTG em concentração final e incubada durante 4 h, a 37°C para a expressão do FC recombinante. Amostras de 200 μL foram retiradas transcorridos os tempos de indução de 1h (t_1), 2h (t_2), 3h (t_3) e 4h (t_4). Após a indução, as células referentes a 500 mL de cultura foram centrifugadas a 6.000xg (4°C) e o precipitado ressuspenso em 20 mL de tampão A. Após 30 min de incubação em gelo com

Lisozima (0,5 mg/mL), sonicou-se a mistura 8 vezes durante 15 s cada, com intervalos de 30 s (em gelo). Após a lise, a mistura foi submetida a uma nova centrifugação a 30.000xg (4°C) e o precipitado foi separado do sobrenadante.

O sobrenadante foi então filtrado e aplicado em uma coluna com 2 mL de resina de níquel Ni-NTA (Qiagen) previamente equilibrada com tampão A. Após a passagem do sobrenadante lavou-se a resina com 20 mL do tampão A acrescida de 10 mM de imidazol (10 volumes), para a retirada de contaminantes com baixa afinidade. Posteriormente, para a eluição da proteína de interesse, utilizou-se a solução tampão A acrescida de 100 mM de imidazol e frações de 1 mL foram coletadas. Alíquotas destas frações foram reservadas e preparadas para análise por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 15%). Foram realizados testes de clivagem com a protease Trombina e verificou-se que 2,5 unidades clivavam aproximadamente 1 mg da proteína de fusão em 5h. Assim, utilizou-se 40 μL (40 unidades) de Trombina para clivar aproximadamente 15 mg de proteína de fusão ligada à resina (6 h de clivagem, a 12°C e agitação suave de 70 rpm).

Uma alíquota após clivagem foi reservada para análise através de eletroforese (SDS-PAGE 15%). Após a clivagem, a solução foi concentrada e submetida a uma cromatografia de exclusão molecular na coluna Superdex-75 para separar o FC da cauda com histidinas (6xHis) e de contaminantes de alta massa molecular. O fluxo utilizado na cromatografia foi de 0,5 mL/min, monitorado pela absorbância em λ = 280 nm e o eluído coletado em frações de 0,5 mL. Alíquotas das frações coletadas, contendo proteína, foram convenientemente preparadas para análise por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 15%).

3.2.3 Expressão e purificação do Domínio GTPase recombinante

Ensaios de expressão do domínio GTPase (DGTPase) utilizando os clones **pGEX-DOM1** e **pET28-DOM1** (aminoácidos 124-408) foram realizados. Tentativas de expressão na linhagem bacteriana BL21(DE3) variando-se à concentração de indutor (IPTG) e a temperatura de incubação não produziram resultados satisfatórios. A proteína produzida, em ambas as construções, ficou na fração insolúvel (corpos de inclusão). Tentativas de expressão nas linhagens bacterianas AD494 e ORIGAMI, como a utilização de detergente (Tween) não foram suficientes para causar a solubilização do produto expressso. No capítulo 4, retornaremos a discutir as prováveis causas da insolubilidade do DGTPase (124-408) descrita nesta seção.

Contudo, testes de expressão utilizando os clones **pGEX-DOM2** e **pET28-DOM2** (aminoácidos 144-416) levaram o produto expresso para a fração solúvel. No caso da primeira construção, utilizamos aproximadamente as mesmas condições estabelecidas para a expressão e purificação da Bradeiona β e do FC. Células de *E. coli* AD202 contendo DNA plasmidial purificado **(pGEX-DOM2)** foram inoculadas em um frasco de 500 mL, que foi incubado sob agitação a 37°C até atingir $D.O._{600nm} \approx 0,7$. Em seguida, adicionou-se IPTG (0,5 mM) e a cultura foi incubada a 20°C durante 10 h. Alíquotas de cada etapa foram retiradas, para análise através de eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 15%).

Após a indução à 20°C as células referentes a 500 mL de cultura foram centrifugadas a 6.000xg (4°C) e o precipitado ressuspenso em 20 mL de tampão A. Em seguida acrescentou-se Lisozima (0,5 mg/mL) deixando a mistura em gelo durante 30 mim. Subsequentemente, sonicou-se a mistura 8 vezes durante 30 s cada, com intervalo de 30 s (em gelo). Após a lise, a mistura foi submetida a uma nova centrifugação à 30.000xg (4°C) e o precipitado foi separado do sobrenadante.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

O sobrenadante foi então filtrado e aplicado em uma coluna com 2 mL da resina Glutathione Sepharose 4B (previamente equilibrada no tampão A). Após a passagem do sobrenadante, lavou-se a resina com 20 mL do tampão A (10 volumes). Em seguida, foi realizado uma eluição da proteína de fusão com um tampão contendo 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0, 1mM $CaCl_2$, 10 mM de GSH. A eluição foi coletada e uma alíquota prepara para análise através de eletroforese (SDS-PAGE 15%). Em seguida, o volume total da eluição foi concentrado até ~3 mL em um centripep-30 e dialisado em tampão A (membrana com corte de 12-14 kDa) para retirada da GSH e contaminantes de baixa massa molecular (< 12 kDa).

Com o clone **pET28-DOM2** realizamos vários testes de expressão. Para avaliar a solubilidade do produto expresso, variamos a concentração de indutor (IPTG) e a temperatura de incubação. Células de *E.* coli ER2566 foram transformadas por choque térmico com DNA plasmidial purificado do clone positivo. Foi utilizado 1 mL de uma cultura *overnight* para inocular 100 mL de meio LB acrescido de canamicina (50 µg/mL) e incubado sob agitação a 37°C até atingir $D.O._{600nm} \approx 0,5$.

A cultura foi então induzida com 0,5 mM de IPTG em concentração final e incubada durante 10 h, a 20°C para a expressão do DGTPase recombinante. Após a indução, as células referentes a 100 mL de cultura foram centrifugadas a 6.000xg (4°C) e o precipitado ressuspenso em 20 mL de tampão A. Acrescentou-se lisozima (0,5 mg/mL) e incubou-se a solução durante 30 min em gelo e posteriormente, sonicou-se a mistura 8 vezes durante 15 s cada, com intervalos de 30 s (em gelo). Após a lise, a mistura foi submetida a uma nova centrifugação a 30.000xg (4°C), o precipitado foi separado do sobrenadante.

O sobrenadante foi filtrado e aplicado em uma coluna com 2 mL de resina de níquel Ni-NTA. Após a passagem do sobrenadante, lavou-se a resina com 20 mL do tampão A acrescido de 10 mM de imidazol (10 volumes), para a retirada dos

contaminantes com baixa afinidade. Para a eluição da proteína de interesse, utilizou-se a solução tampão A acrescida de 100 mM de imidazol e frações de 1,5 mL foram coletadas. Alíquotas destas frações foram prepararas para analise por eletroforese (SDS-PAGE 15%). Em seguida, as alíquotas contendo 6xHis+DGTPase recombinante foram reunidas e dialisadas (membrana com corte de 12-14 kDa) em tampão A para retirada do imidazol e contaminantes de baixa massa molecular (< 12 kDa).

3.2.4 Expressão da proteína recombinante Bradeiona α

Testes de expressão da septina Bradeiona α utilizando o clone **pGEX-Bradα** foram realizados. Tentativas de expressão na linhagem bacteriana AD202 variando-se à concentração de indutor (IPTG) e a temperatura de incubação não produziram resultados satisfatórios. Nenhuma proteína recombinante foi detectada em todas as condições analisadas. No capítulo 4, voltaremos a discutir os prováveis motivos da ausência de expressão da septina Bradeiona α em *E. coli*.

3.3 Cálculo da concentração protéica

Em todos os casos, a concentração da proteína recombinante foi determinada através de absorção no comprimento de onda de λ = 280 nm, em um espectrofotômetro Hitachi U-2001, utilizando o coeficiente de extinção teórico (ε) calculado através da análise da composição dos aminoácidos da estrutura primária [35]. Os valores dos coeficientes de extinção teóricos obtidos para cada proteína recombinante analisada e outros parâmetros pertinentes, estão exibidos na tabela 3.2.

	M.M. (Da)	ε ($M^{-1}cm^{-1}$)	pI	R
Bradeiona β	55.098,1	45.570	5,77	5W, 21F,13Y
DGTPase	31.587,9	21.980	5,77	2W , 13F, 8Y
FC	13.351,5	21.030	4,67	3W, 5F, 3Y
GST+DGTPase	58.122,8	62.900	5,83	6W, 22F,22Y
GST+Brad β	81.633.0	86.490	5.81	9W, 30F, 27Y
GST	28.027,4	40.920	6,01	4W,10F, 14Y

Tabela 3.2: Parâmetros pertinentes de cada proteína recombinante analisada: massa molecular (M.M.), coeficiente de extinção teórico (ε), ponto isoelétrico (pI) e resíduos fluorescentes (R).

3.4 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

O conhecimento da estrutura tridimensional nativa de uma proteína é fundamental no entendimento de suas funções biológicas. Porém, é grande a dificuldade envolvida na determinação dessas estruturas começando, por exemplo, com a obtenção de cristais de proteínas. Assim, são necessárias metodologias alternativas que forneçam informações diretas sobre a estrutura secundária de qualquer proteína. A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) aparece como uma ferramenta sensível, para estimar a porcentagem das componentes presentes na estrutura secundária de proteínas em solução [37].

As análises de CD foram realizadas em um espectropolarímetro J-715 (Jasco Inc., Japão), utilizando-se uma cubeta cilíndrica de quartzo com 1 mm de caminho óptico. Um total de 16 varreduras, no intervalo de comprimento de onda de 250 nm a 190 nm, foram efetuadas para determinação de uma média. A temperatura de cada análise foi mantida estável em 18°C. Em todas os casos, a proteína recombinante analisada estava em solução tampão 25 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl, pH 8,0 e densidade óptica em λ = 280 nm de 0,2. Os espectros foram transformados em elipticidade molar [θ] e a concentração protéica determinada através da análise da seqüência primária (veja seção 3.3). Para estimar o

conteúdo de estrutura secundária da Bradeiona β, o espectro obtido foi desconvoluído utilizando-se o programa *SELCON* 3 [38].

3.5 Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é muito utilizada no estudo de proteínas devido, principalmente, à presença de três fluoróforos naturais: a tirosina, o triptofano e a fenilalanina [39]. Os espectros de emissão dos resíduos de triptofano, por exemplo, podem refletir a polaridade do solvente que os envolve, e os espectros das proteínas em muitos casos são sensíveis às ligações de substratos, reações de associação e desnaturações. Os experimentos com proteínas são realizados com comprimentos de onda de excitação no máximo da absorção de 250 nm ou em comprimentos de onda maiores. A fenilalanina tem seu máximo de absorção em aproximadamente 260 nm. Na região de comprimento de onda de 280 nm a fluorescência é devida a tirosina e ao triptofano. Seus máximos de emissão em água são 303 nm e 348 nm, respectivamente [39]. Estes máximos são altamente sensíveis à polaridade do solvente. Desta forma o máximo de emissão de fluorescência das proteínas é dependente dos fatores que afetam a exposição dos fluoróforos ao solvente, levando então à dependência da estrutura tridimensional da proteína.

As análises fluorimétricas foram realizadas em um fluorímetro K2 ISS equipado com um sistema de controle de temperatura, utilizando cubetas de 1 cm de caminho óptico. Em todas as análises do Fragmento conservado, as amostras foram excitadas em $\lambda = 295$ nm e os espectros de emissão de fluorescência monitorados no intervalo de comprimento de onde de $\lambda = 310$ nm a $\lambda = 450$ nm. A proteína analisada estava em solução tampão 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8,0, densidade óptica em $\lambda = 280$ nm de 0,15 (7 μM) e temperatura controlada de 18°C.

3.6 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

A cristalização de macromoléculas biológicas representa um dos passos limitantes no estudo da estrutura tridimensional, através da técnica de difração de raios X. Observações empíricas sugerem que macromoléculas que são monodispersas e homogêneas em solução (isto é, que possuem apenas moléculas do mesmo tamanho) cristalizam com maior facilidade, enquanto agregados aleatórios ou sistemas polidispersos dificilmente cristalizam. Portanto, espalhamento dinâmico de luz (DLS) apresenta-se como uma técnica simples e rápida para explorar condições em que a proteína em solução seja monodispersa [40].

As análises de DLS foram realizadas em um equipamento DynaPro Molecular Sizing instrument (DYNAMICS versão 5, Proteins Solutions, Inc.). Em todos os casos, foram realizadas 60 aquisições com intervalos de 2 s. As proteínas recombinantes estavam em 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0 e foram centrifugadas a 16.000xg antes de cada análise, durante 15 min (4°C) e subsequentemente introduzidas em uma cubeta de quartzo com volume de análise de 12 μL. Em todas as análises a concentração protéica utilizada foi de aproximadamente 1,0 mg/mL.

3.7 Métodos de bioinformática

A bioinfomática é uma área da ciência que utiliza a tecnologia da computação para organizar, analisar e distribuir informações biológicas com a finalidade de responder perguntas mais complexas neste campo da ciência. Técnicas de bioinformática foram utilizadas, neste trabalho, com o objetivo de se estudar as características da estrutura

secundária das proteínas Bradeiona α e β. O alinhamento múltiplo de nove seqüências primárias de septinas humanas foram realizadas com a utilização do programa CLUSTAL-X [41]. Para predição de estrutura secundária empregamos o programa PSIPRED [42].

3.8 Estudos enzimáticos através de eletroforese capilar (CE)

Ensaios de atividade GTPase comumente encontrados na literatura científica, envolvem a detecção do fosfato marcado (radioativo, ^{32}P), liberado após a hidrólise do 5'-trifosfato de guanosina radiativo (GTP) [43]. Porém, essa técnica implica em todas as conhecidas desvantagens de se trabalhar com material radioativo, além de não apresentar boa precisão. Métodos de análise livre de radioisótopos foram desenvolvidos usando técnicas cromatográficas (HPLC) [44] e, mais recentemente, Kawata e colaboradores [45] relataram um método de análise por eletroforese capilar na qual quantificavam GTP e GDP produzidos após hidrólise enzimática.

Na eletroforese capilar (CE), o processo acontece em capilares com diâmetro interno de 25 a 75 μm que são usualmente preenchidos apenas com um tampão. A alta resistência elétrica do capilar possibilita a aplicação de campos elétricos elevados (100 a 500 V/cm), com geração mínima de calor, o que resulta em separações rápidas, alta eficiência e boa resolução. Em razão dos vários mecanismos de separação que possibilitam a análise simultânea de todos os solutos, independentemente da carga, da necessidade de volumes mínimos de amostras (5 a 50 nL), do uso mínimo de reagentes, da possibilidade de detecção no próprio capilar e do potencial para análise quantitativa, a CE passou a ser uma técnica de crescimento rápido nos últimos anos e bastante atrativa sob o ponto de vista analítico. Um diagrama ilustrativo de um experimento utilizando eletroforese capilar é exibido na figura 3.17.

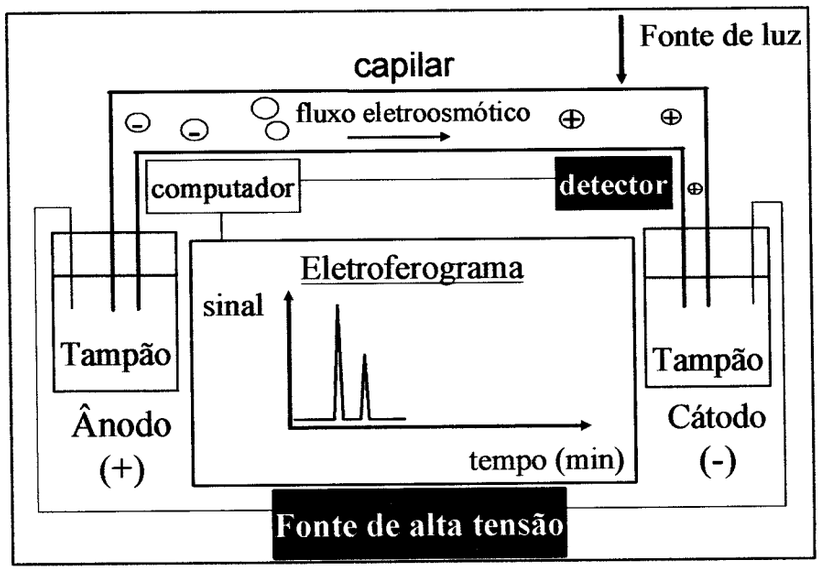


Figura 3.17: Diagrama ilustrativo de um experimento de CE.

Com base no método proposto na referência [45], adequamos o procedimento descrito e aplicamos a técnica para investigar a possível atividade GTPase da proteína Bradeiona β e de seu domínio GTPase. Os experimentos de CE foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Emanuel Carrilho e o aluno de doutoramento Sandro Hillebrand, ambos do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP). Vários testes foram realizados para tentar definir uma condição ótima de separação e quantificação das espécies (GTP e GDP). Na tentativa de encontrar esta condição ótima, diferentes tampões foram empregados, já que o pH e os componentes dos tampões de corrida possuem efeito significante no tempo de migração e na separação das espécies analisadas. Ótimas separações, entre GTP e GDP, foram obtidas utilizando o tampão de corrida composto por 10 mM MES, pH 6,5.

Foram utilizados dois métodos diferentes para a separação das espécies: i) um empregando capilar sem recobrimento interno, com aplicação de potencial positivo na extremidade de introdução de amostra, e outro ii) empregando capilares com recobrimento interno de PVA e aplicação de potencial negativo. Os dois métodos utilizados

apresentaram boa separação das espécies, porém as análises em capilar recoberto foram mais reprodutíveis e rápidas. Assim, este último método foi utilizado quando um grande número de amostras precisava ser analisada.

Todas as análises através de CE foram realizadas, seguindo basicamente as etapas descritas abaixo:

1) as reações enzimáticas foram iniciadas pela adição de GTP e incubação a temperatura controlada de 28°C (em tampão A);

2) alíquotas de 30 μL foram retiradas em tempos bem determinados, subsequentemente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas no freezer -80°C;

3) antes de cada análise por CE, cada alíquota foi descongelada e centrifugada a 13.000xg durante 5 min (centrífuga Eppendorf);

4) as análises por CE foram realizadas em um equipamento HP 3DCE (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), monitoradas no comprimento de onda λ = 254 nm (máximo de absorção dos nucleotídeos GTP e GDP);

5) a eletroforese foi realizada, utilizando-se capilares de 50 cm de comprimento e diâmetro interno de ID = 50 μM. Uma diferença de potencial de 28 kV foi aplicada e as amostras foram hidrodinamicamente introduzidas, usando uma pressão de 50 mbar durante um intervalo de tempo de 5 s (volume de aproximadamente 9 nL);

6) antes de cada injeção, o capilar sem recobrimento interno foi lavado com 0,1 M de NaOH durante 30 s, H_2O durante 1 min e tampão de corrida durante 1,5 min. O capilar com recobrimento interno de PVA, foi somente lavado com H_2O durante 1 min e tampão de corrida durante 2 min;

7) as concentrações de GTP e GDP foram determinas através das áreas relativas dos picos resolvidos no eletroferograma, considerando que a soma das mesmas era sempre igual a 100% dos nucleotídeos inicias.

IFSC-USP SERVIÇO DE INFORMAÇÃO

3.8.1 Dependência de um cofator para hidrólise do GTP (ATP)

A atividade de muitas enzimas depende de sua própria estrutura como proteína e, assim, da particular conformação que cada uma assume. Entretanto, há enzimas que, além disso, necessitam de substâncias adicionais, os cofatores. Algumas pequenas GTPases, mostram-se totalmente dependentes de íons Mg^{2+} para coordenar e hidrolisar GTP [20,21]. Com o conhecimento prévio desta informação, resolvemos estudar a influência de íons inorgânicos (Mg^{2+} e Mn^{2+}) na atividade GTPase da septina Bradeiona β e da fusão GST+DGTPase.

3.8.1.1 Influência do Mg^{2+} na atividade da Bradeiona β

Os experimentos utilizados para averiguar a influência do cofator (Mg^{2+}) na atividade GTPase da proteína Bradeiona β, estão organizados na tabela 3.3. Foram realizados ensaios na ausência e com quatro concentrações distintas de íons Mg^{2+}. A concentração de GTP foi mantida constante (5 mM) em todas as condições.

A concentração de proteína utilizada foi de 2,5 μM. Controles na ausência de proteína e íons Mg^{2+} foram realizados, para constatarmos que não estava ocorrendo hidrólise espontânea do substrato nas condições utilizadas. Cada reação possuía volume final de 200 μL, em tampão contendo 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8,0. Alíquotas foram retiradas nos tempos t_i = 10, 30, 60 e 120 mim, com i = 1 a 4.

Experimento	[GTP] (mM)	[Mg^{2+}] (mM)	[Bradeiona β] (μM)
01	5	0,25	2
02	5	1	2
03	5	2,5	2
04	5	5	2
05	5	1	0
06	5	0	2

Tabela 3.3: Análise da influência de íons Mg^{2+} na atividade GTPase da proteína Bradeiona β. Experimentos **1-4**: reações com distintas concentrações de co-fator. Experimentos **5** e **6**: controles na ausência de proteína e de íons Mg^{2+}.

3.8.1.2 Influência do Mg^{2+} na atividade do domínio GTPase

Similarmente a Bradeiona β, realizamos experimentos para averiguar a influência do cofator (Mg^{2+}) na atividade do domínio GTPase. Todas as reações estão organizadas na tabela 3.4. Cada reação possuía volume final de 250 μL, em tampão contendo 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8,0. Alíquotas foram retiradas nos tempos t_i = 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120 e 300 mim, com i = 1 a 7. Controles na ausência de proteína e íons Mg^{2+} foram realizados.

Experimento	[GTP] (mM)	[Mg^{2+}] (mM)	[DGTPase] (μM)
01	3	0,5	3,1
02	3	1	3,1
03	3	2,5	3,1
04	3	2,5	3,1
05	3	2,5	3,1
06	3	8,5	3,1
07	3	10	3,1
08	3	0,5	0
09	3	1	0
10	3	2,5	0
11	3	8,5	0
12	3	10	0
13	3	0	3,1

Tabela 3.4: Análise da influência de íons Mg^{2+}, na atividade GTPase do domínio GTPase. Experimentos **1-7**: reações com distintas concentrações de co-fator. Experimentos de **8-12**: controles na presença de íons Mg^{2+} e ausência de proteína. Experimentos **3-5**: triplicatas da reação com 2,5 mM de Mg^{2+}. Experimento **13**: controle na presença de proteína e ausência de íons Mg^{2+}.

3.8.1.3 Influência do Mn^{2+} na atividade do domínio GTPase

Experimentos foram realizados com a finalidade de averiguar a influência do íon Mn^{2+} na atividade do domínio GTPase. Todas as reações realizadas estão organizadas na tabela 3.5. Cada reação possuía volume final de 250 μL, em tampão contendo 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8,0. Alíquotas foram retiradas nos tempos t_i = 30, 120, 180 e 720 mim, com i = 1 a 4. Controles na ausência de proteína, íons Mn^{2+} e íons Mg^{2+} foram realizados.

Experimento	**GTP (mM)**	**[Mn^{2+}]**	**[Mg^{2+}]**	**[DGTPase] (μM)**
01	0,5	0,5	0	3,1
02	0,5	0	0,5	3,1
03	0,5	0	0	3,1

Tabela 3.5: Análise da influência de íons Mn^{2+}, na atividade GTPase do DGTPase. Experimento **1**: reação na presença de íons Mn^{2+}. Experimento **2**: reação na presença de íons Mg^{2+}. Experimento **3**: controle na presença de proteína e ausência de íons Mn^{2-} e Mg^{2+}.

3.8.2 Determinação da constante de Michaelis-Menten

O simples mecanismo enzimático de Michaelis-Menten é ilustrado pela reação abaixo [46]:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} [ES] \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} E + P \qquad (1)$$

onde E representa a enzima, S o substrato, [ES] o complexo enzima-substrato, P o produto e k_i são os valores das constantes de reação. Neste estudo, assumiremos a aproximação de estado estacionário, ou seja, a concentração do substrato é muito maior do que a concentração da enzima ([E] << [S]), implicando que a formação do complexo [ES] não altera a concentração do substrato. Somente um único substrato e um único complexo

enzima-substrato estarão envolvidos, e o complexo enzima-substrato é quebrado diretamente na forma de enzima livre e produto ($k_{-2} << k_2$).

A constante de Michaelis-Menten (K_m) pode ser obtida através do ajuste da equação (2) abaixo nos pontos experimentais obtidos. V_{max} é a velocidade máxima e [S] é a concentração de substrato.

$$v_i = \frac{V_{max}}{\left\{1 + \frac{K_m}{[S]}\right\}} \qquad (2)$$

3.8.2.1 Determinação da constante de Michaelis-Menten: Bradeiona β – GTP

Os experimentos utilizados na determinação da constante de Michaelis-Menten, estão esquematizados na Tabela 3.6.

Experimento	**[GTP] (mM)**	**[Mg^{2+}] (mM)**	**[Bradeiona β] (μM)**
01	1	1	2
02	2	1	2
03	3	1	2
04	3	1	2
05	3	1	2
06	4	1	2
07	5	1	2
08	1	1	0
09	2	1	0
10	3	1	0
11	4	1	0
12	5	1	0
13	3	0	2

Tabela 3.6: Determinação da constante de Michaelis-Menten. Experimentos **1-7**: reações com distintas concentrações de GTP. Experimentos **3-5**: triplicata da reação com concentração de 3 mM de GTP. Experimentos de **8-12**: controles na presença de íons Mg^{2+} e ausência de proteína. Experimento **13**: controle na presença de proteína e ausência de íons Mg^{2+}.

Foram utilizadas cinco distintas concentrações de GTP. A concentração de íons Mg^{2+} (1 mM) e proteína (2 μM) foram mantidas constantes em todas as reações enzimáticas. Controles na ausência de proteína e íons Mg^{2+} foram realizados. Cada reação possuía volume final de 250 μL, em tampão contendo 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8,0. Alíquotas foram retiradas nos tempos t_i = 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120 e 300 mim, com i = 1 a 7.

3.8.2.2 Determinação da constante de Michaelis-Menten: DGTPase - GTP

Similarmente a Bradeiona β, realizamos experimentos para determinar a constante de Michaelis-Menten para o domínio GTPase. Todas as reações estão esquematizadas na tabela 3.7.

Experimento	**[GTP] (mM)**	**[Mg^{2+}] (mM)**	**[DGTPase] (μM)**
01	0,5	1	3,1
02	1	1	3,1
03	1,5	1	3,1
04	2	1	3,1
05	3	1	3,1
06	3	1	3,1
07	3	1	3,1
08	4	1	3,1
09	5	1	3,1
10	0,5	1	0
11	1	1	0
12	1,5	1	0
13	2	1	0
14	3	1	0
15	4	1	0
16	5	1	0
17	3	0	3,1

Tabela 3.7: Determinação da constante de Michaelis-Menten. Experimentos **1-9**: reações com distintas concentrações de GTP. Experimentos **5-7**: triplicata da reação com concentração de 3 mM de GTP. Experimentos de **10-16**: controles na presença de íons Mg^{2+} e ausência de proteína. Experimento **17**: controle na presença de proteína e ausência de íons Mg^{2+}.

Cada reação possuía volume final de 250 μL, em tampão contendo 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8,0. A concentração de íons Mg^{2+} (1 mM) e proteína (3,1 μM) foram, mantidas constantes em todas as reações enzimáticas. Alíquotas foram retiradas nos tempos t_i = 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120 e 300 mim, com i = 1 a 7.

3.8.2.3 Determinação da constante de Michaelis-Menten: DGTPase – ATP

Os experimentos desta seção foram realizados de forma idêntica aos experimentos da seção 3.8.2.2. Nosso objetivo com esta análise é estudar a especificidade do domínio GTPase da Bradeiona β por dois diferentes nucleotídeos (GTP e ATP). As reações são as mesmas indicadas na tabela 3.7 com a exceção que substituímos o substrato GTP por ATP (nas mesmas concentrações estipuladas anteriormente).

3.9 Determinação do conteúdo de nucleotídeo unido

A quantidade de nucleotídeo unida na proteína Bradeiona β, após purificação, foi determinada através do método descrito por Seckler [47]. Ácido perclórico ($HClO_4$) foi adicionado a uma solução de proteína Bradeiona β (concentração conhecida) em uma concentração final de 0,5 M e incubada em gelo durante aproximadamente 15 min. Em seguida, a solução foi centrifugada a 16.000xg durante 15 min (4°C) para a retirada da fração precipitada. O sobrenadante foi então medido espectrofotometricamente (λ = 254 nm) e a concentração de nucleotídeo (GDP/GTP) determinada assumindo um coeficiente de extinção molar de ε_{254nm} = 12.400 $M^{-1}.cm^{-1}$ (para meio ácido).

3.10 Ensaios de cristalização

Para a análise estrutural de proteínas através da difração de raios X deve-se necessariamente obter monocristais que apresentem um padrão de difração adequado [48]. Na cristalização, deve-se primeiramente alcançar o ponto de supersaturação, onde os cristais são formados, e em seguida crescê-los a tamanhos suficientes para o experimento de difração [49]. Como são vários os fatores que interferem na solubilidade da proteína, sua cristalização torna-se um processo multiparamétrico. Dentre as variáveis, pode-se citar: temperatura, pH, pressão, agentes precipitantes e solventes orgânicos [50]. A pureza química e a homogeneidade estrutural são requerimentos indispensáveis, além do que a energia associada ao arranjo cristalino deve ser menor do que aquela associada ao estado amorfo.

A cristalização de proteínas envolve as três clássicas etapas: nucleação, crescimento e cessação de crescimento [50]. Dentre os métodos mais utilizados e viáveis pode-se citar a difusão de vapor pela gota suspensa, onde, à medida que o volume da gota diminui, aumenta-se a concentração da proteína e do agente precipitante. O estado cristalino é obtido quando a concentração da proteína em solução é maior do que seu limite de solubilidade (condição termodinamicamente instável), ou seja, a proteína se encontra no estado de supersaturação.

Os cristais de macromoléculas são mantidos por ligações de hidrogênio, pontes salinas, interações de van der Waals e interações entre dipolos nas regiões de contato, uma vez que proteínas interagem através de uma pequena região [51]. A maior parte da superfície dessas moléculas, grandes e geralmente globulares, interage com o solvente [52], que preenche o volume cristalino não ocupado por elas. Dessa forma verificam-se duas fases distintas na constituição do cristal de proteínas (sólida e líquida), que os tornam frágeis ao manuseio e sensíveis ao solvente.

Os experimentos de cristalização constituíram em avaliar o comportamento da proteína Bradeiona β e do FC em solução ante as condições propostas nos fatoriais da *Hampton Research Corp.* [53], pelo método de difusão de vapor com gota suspensa. Foram testados os seguintes fatoriais: Crystal Screen (fatorial I), Crystal Screen 2 (fatorial II), Grid Screen $(NH_4)_2SO_4$ e Screen PEG6000. Na montagem desses experimentos de cristalização, por difusão de vapor através da gota suspensa, colocou-se no poço 500 μL de uma das soluções dos fatoriais. Da solução do poço, foram retirados 2,5 μL e misturados com outros 2,5 μL da solução da Bradeiona β ou FC a 10 mg/mL (25 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl, pH 8,0). Com a nova solução obtida, foi montada a gota suspensa em uma lâmina na parte superior do poço (vedada com graxa de vácuo). Os experimentos de cristalização foram realizados em caixas de cristalização contendo, cada uma, 24 câmaras de troca de vapor. Os experimentos foram montados em ambientes isolados com temperaturas constantes de 4°C e 18°C. Depois de montadas as câmaras de vapor foram deixadas em estrito repouso. A análise visual dessas gotas eram realizadas sempre após transcorridos quinze dias.

3.11 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR)

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) foi aplicada com a finalidade de analisar a estrutura tridimensional do Fragmento conservado (FC). Medidas preliminares unidimensional de NMR foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS), utilizando um espectrômetro Varian Inova, operando a 14,1 T (correspondente à freqüência de 600 MHz). Foram realizados experimentos H-1D a 20°C em pH 7,0 e a 25°C em pH 6,3. A amostra estava em solução tampão fosfato de potássio

($KH_2(PO_4)_3$ + $K_2H(PO_4)_3$) 100 mM, pH 7,0 em uma concentração de aproximadamente 4 mM e foi acrescida de H_2O, DSS (0,01M), EDTA (0,1M) e NaN_3 (0,5M).

3.12 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) foi utilizada com o objetivo de estudar a afinidade de íons Mn^{2+} por GTP e pela proteína de fusão GST+DGTPase. As medidas de EPR-CW foram realizadas em um espectrômetro Bruker-ELEXSYS E580, que opera tanto em modo de onda contínua (CW) quanto pulsado e está equipado com ponte de microondas em banda X (9,5 GHz). Para as medidas em questão utilizamos, ainda, cavidade retangular e campo de modulação de 100 kHz. A amplitude de modulação do campo bem como a potência de microondas foram ajustadas para maximizar a relação sinal-ruído para cada valor de concentração de Mn^{2+}. Os estoques de GTP, $MnCl_2$ e da proteína de fusão GST+DGTPase (144-416) estavam em tampão composto de 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0. Inicialmente, foram realizadas medidas do sinal do Mn^{2+} livre (400 μM) em solução e na presença de quantidade equimolar de GTP. Em seguida, medimos o sinal do Mn^{2+} na presença de GTP na proporção 4:1 (320μM Mn^{2+}: 80μM GTP). Finalmente, medimos o sinal do Mn^{2+} na presença de GST+DGTPase (144-416) na proporção 4:1 (320μM Mn^{2+}: 80μM proteína de fusão).

Capítulo 4

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO

Resultados e discussões

Inúmeros fatores limitam o progresso no caminho da compreensão da bioquímica de septinas. Entre estes, inclui-se a necessidade de ótimos sistemas de expressão, os quais permitam a produção de quantidades suficientes de material homogêneo e biologicamente ativo para subseqüente caracterização, incluindo cristalização. A dificuldade na expressão e purificação de uma septina humana recombinante deve-se provavelmente à baixa estabilidade do produto, com tendência a agregar e precipitar. Porém, um elegante e bem sucedido sistema múltiplo de expressão para septinas de mamíferos foi descrito para as proteínas SEPT2, SEPT6 e SEPT7 utilizando um vetor bicistrônico [16]. No entanto, as proteínas expressas individualmente, com His-*tag*, foram apenas produzidas em pequenas quantidades, instáveis e com tendência a precipitarem em solução. A septina SEPT7, por exemplo, é descrita na literatura científica como insolúvel quando expressa individualmente em bactéria [15,16] ou células de eucariotos [14]. Este comportamento não é o verificado em nosso protocolo de expressão e purificação da septina humana Bradeiona β, o qual resultou em um produto estável em quantidades suficientes para subseqüente caracterização, incluindo análises espectroscópicas, estudos de atividade catalítica e ensaios de cristalização. Embora a proteína não apresente mais atividade após transcorrido certo tempo (~ 36 h), a mesma não precipitava rapidamente na ausência da proteína de fusão.

4.1 Bradeiona β

4.1.1 Subclonagem, expressão e purificação

A primeira construção com o cDNA da proteína Bradeiona β foi elaborada no laboratório da Dra. M. Tanaka[2] e o clone correspondente, gentilmente cedido para nosso grupo de pesquisa. O cDNA da Bradeiona β estava inserido no vetor de expressão bacteriano pProEX HTb nos sítios *Sma*I e *Xho*I. A construção final tinha, além do cDNA da Bradeiona β, uma cauda com histidinas (6xHis) no N-terminal e um sítio de clivagem para a protease rTEV. Todos os testes de expressão do cDNA da proteína Bradeiona β realizados com este vetor não produziram resultados satisfatórios. A proteína foi expressa na fração insolúvel (corpos de inclusão) sendo necessário uma purificação desnaturante, o que nos levou a utilizar um novo sistema de expressão.

Desse modo, o cDNA da Bradeiona β foi amplificado através da técnica de PCR, utilizando como molde inicial o cDNA clonado no vetor pProEX HTb, e subclonado no vetor de expressão bacteriano pGEX-5X-1. A concentração de $MgSO_4$ e a temperatura de anelamento foram variadas em função de se obter o amplificado mais específico possível. Utilizou-se para a polimerização a enzima Deep Vent DNA que possui atividade corretiva dos nucleotídeos que incorpora, reduzindo o risco de mutações, ou seja, aumentando assim a confiabilidade do produto obtido.

A figura 4.1(A) mostra o resultado do produto de PCR com uma banda de aproximadamente 1.500 pb referente ao cDNA da Bradeiona β.

---

[2] *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba, Japan.*

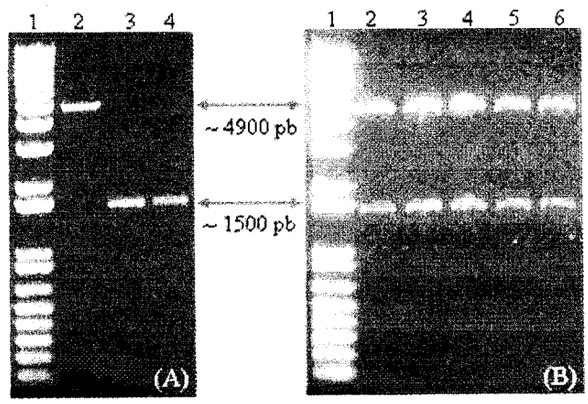


Figura 4.1: Amplificação do cDNA da Bradeiona β e confirmação dos clones positivos por análise de restrição. **A)** Gel de agarose (0,8 % TAE) do produto de PCR. **1.** Padrão de massa molecular (1 kb Plus/Promega). **2.** Vetor de expressão pGEX-5X-1 linearizado. **3** e **4.** Produto de PCR mostrado uma banda de aproximadamente 1.500 pb referente ao cDNA da Bradeiona β. **B) 1.** Padrão de massa molecular, **2** a **6.** Vetor bacteriano pGEX-5X-1 e cDNA da Bradeiona β após digestão (sítios de *Bam*HI e *Xho*I).

Os recombinantes foram confirmados por análise de restrição do DNA plasmidial com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I, observada em eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, como pode ser observado na figura 4.1(B). O sequenciamento confirmou a subclonagem do cDNA, dentro do correto quadro de leitura do vetor e um dos clones positivos (**pGEX-Bradβ**) foi selecionado para testes de expressão.

Após a transformação de células de *E. coli* AD202 competentes por $CaCl_2$, com o clone **pGEX-Bradβ**, realizamos ensaios de expressão da proteína recombinante. Testes inicias de expressão a 37°C utilizando várias concentrações de IPTG, levaram a totalidade da proteína produzida para a fração insolúvel. Testou-se também expressão a 37°C nas linhagens bacterianas BL21(DE3), ER2566(DE3) e ORIGAMI, porém os resultados não diferiram dos obtidos anteriormente. Contudo, testes de expressão da proteína recombinante a 20°C levaram parte da proteína produzida para a fração solúvel.

Na figura 4.2 observamos bandas adicionais de expressão com intensidades crescentes com o decorrer do tempo, referentes à proteína de fusão com massa molecular de aproximadamente 82 kDa (GST+Bradeiona β).

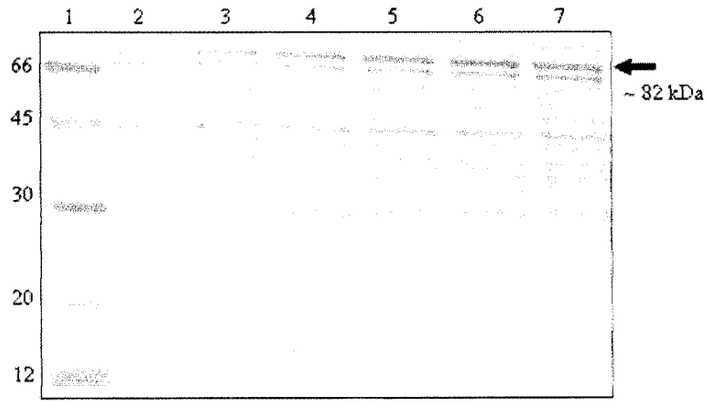


Figura 4.2: Expressão da proteína de fusão (Bradeiona β +GST). Eletroforese (SDS-PAGE 15%) ilustrando extratos totais de *E. coli* AD202 (**pGEX-Bradβ**) durante 10 h de indução com IPTG a 20°C. **1.** Padrão de massa molecular (em kDa). **2.** Cultura não induzida (t_0). **3** a **7.** Cultura induzida a 20°C durante 2h (t_1), 4h (t_2), 6h (t_3), 8h (t_4) e 10h (t_5) respectivamente. A seta indica a proteína de fusão GST+Bradeiona β (~82 kDa).

A proteína de fusão que permaneceu na fração solúvel, após os passos de expressão e lise bacteriana, foi isolada por cromatografia de afinidade utilizando a resina Glutathione Sepharose 4B e posteriormente eluida com tampão A acrescido de 10 mM de GSH. As frações eluídas foram analisadas por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 15%) como podemos verificar na figura 4.3. Analisando o resultado da eletroforese, observamos que além da proteína de fusão (~82 kDa) apareciam inúmeras bandas adicionais, as quais acreditávamos inicialmente que poderiam ser decorrentes de uma atividade proteolítica de enzimas da linhagem bacteriana escolhida para expressão. Assim, optamos pela utilização na solução tampão de inibidores das quatro principais classes de proteases (veja seção 3.2.1).

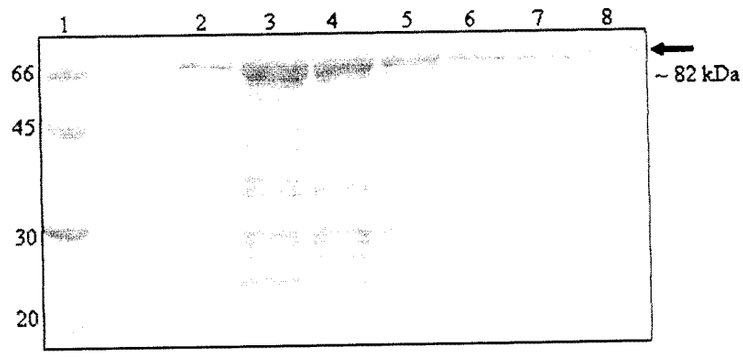


Figura 4.3: Eluição da proteína de fusão GST+Bradeiona β. **1.** Padrão de massa molecular (em kDa). **2** a **8.** Frações eluídas da resina Glutathione Sepharose 4B com tampão A acrescido de glutationa reduzida (10 mM). A seta indica a proteína de fusão com massa de aproximadamente 82 kDa (GST + Bradeiona β).

Porém, o padrão de degradação citado inicialmente (veja figura 4.3) continuou inalterado, sugerindo que a presença de bandas adicionais (com massa molecular inferior a massa da proteína de fusão) poderia ser proveniente de outro fenômeno, como por exemplo, a dificuldade da bactéria em reconhecer o gene subclonado. A existência de codóns raros para *E. coli* na seqüência da Bradeiona β, pode levar a terminação precoce da tradução [54]. Após a eluição da proteína de fusão, realizamos testes de clivagem com a protease Fator Xa para separar a proteína GST da Bradeiona β. A cinética de clivagem da proteína de fusão foi realizada à temperatura de 12°C e os resultados finais podem ser observados na Figura 4.4.

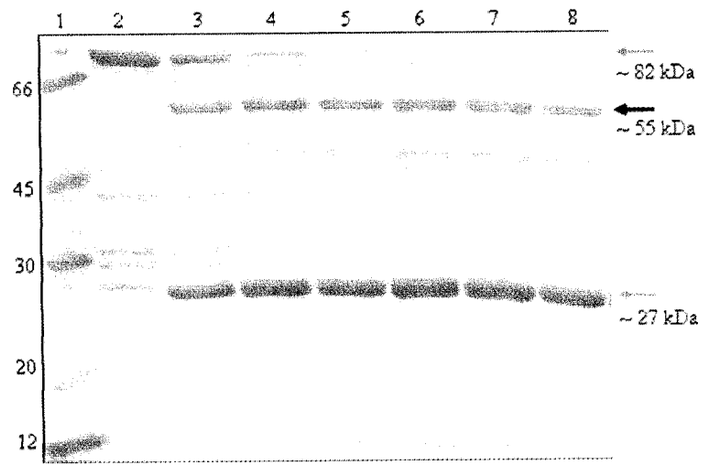


Figura 4.4: Eletroforese (SDS-PAGE 15%) ilustrando a cinética de clivagem da proteína de fusão GST+Bradeiona β utilizando a protease Fator Xa. **1.** Padrão de massa molecular (em kDa). **2.** Amostra antes da adição da protease Fator Xa. **3** a **8.** Alíquotas retiradas durante a clivagem nos tempos de 1h (t_1), 2h (t_2), 3h (t_3), 5h (t_4), 7h (t_5) e 9h (t_6). A GST está indicada pela seta marrom (~27 kDa). A seta azul (~82 kDa) e preta (~55 kDa) indicam as proteínas de fusão e Bradeiona β, respectivamente.

Observando a Figura 4.4, verificamos que a clivagem ocorreu com grande eficiência, sendo total com aproximadamente 5 h de incubação. Uma vez definida as condições de clivagem em solução, optamos em realizar a clivagem da proteína de fusão ainda ligada a resina de afinidade para facilitar a purificação. Foram utilizadas as mesmas condições pré-estabelecidas em solução para a clivagem na resina. Na figura 4.5 (coluna 2), podemos observar a proteína obtida após a clivagem na resina e lavagem com tampão contendo 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM PMSF.

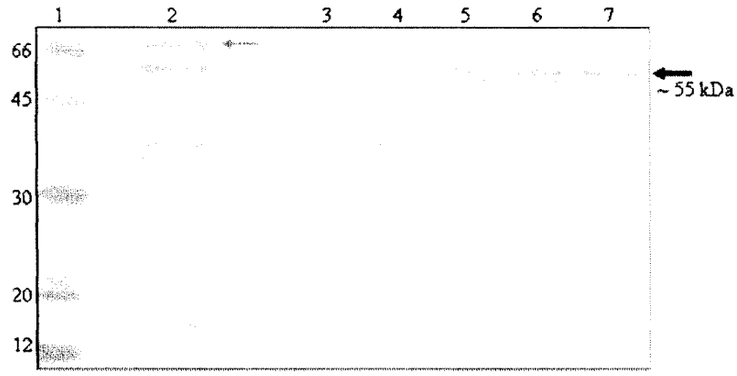


Figura 4.5: Clivagem e purificação da proteína de fusão GST+Bradeiona β imobilizada na resina. Eletroforese (SDS-PAGE 15%) mostrando a lavagem da resina após a clivagem com a protease Fator Xa. **1**. Padrão de massa molecular (em kDa). **2**. Amostra da lavagem da resina após clivagem. **3** a **7**. Alíquotas das frações eluidas após passagem pela coluna de exclusão molecular Superdex-200. A seta marrom indica um contaminante de massa molecular superior a 66 kDa e a seta negra indica a Bradeiona β (~55 kDa) já livre da GST.

Com a clivagem na resina toda a GST ficou ligada à mesma, restando o problema de como eliminar as bandas adicionais (com massa molecular inferior a 55 kDa) e um contaminante de massa molecular superior a 66 kDa (veja figura 4.5, coluna 2). Através de uma cromatografia de exclusão molecular na coluna Superdex-200 foi possível eliminar o contaminante, que eluiu em uma fração após a proteína β-Galactosidase usada como padrão (que possui massa molecular de 116 kDa). A proteína Bradeiona β eluiu em uma fração anterior a proteína β-Galactosidase, sugerindo que a mesma pode estar oligomerizando. Na Figura 4.6, mostramos o perfil da cromatografia de exclusão molecular na Superdex-200 e na figura 4.5 (colunas de 3 a 7) a análise por eletroforese (SDS-PAGE 15%) das alíquotas eluídas desta cromatografia.

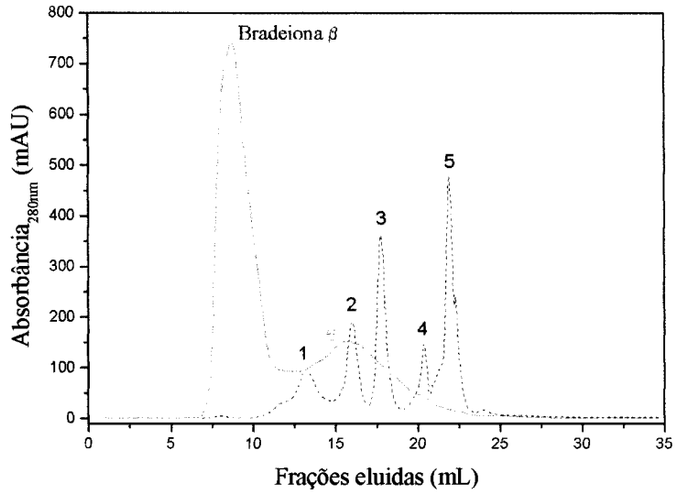


Figura 4.6: Perfil da cromatografia de exclusão molecular da proteína Bradeiona β na resina Superdex 200. Em azul: absorbância a 280 nm em função das frações coletadas (mL). Em pontilhado, padrão de massa molecular: **1**. β-Galactosidade (116 kDa). **2**. Soroalbumina bovina (66 kDa). **3**. Anidrase carbônica (30 kDa). **4**. Citocromo C (12,4 kDa), **5**. Riboflavina (0,4 kDa). O pico 6 é referente ao contaminante (> 66 kDa).

Porém, ainda faltava eliminar os contaminantes adicionais com massa molecular inferior a 55 kDa (oriundos da terminação precoce da tradução ou instabilidade da proteína). Para isso, optou-se inicialmente por uma cromatografia de troca iônica na coluna Mono-Q. Contudo, o resultado foi insatisfatório, pois a proteína interagiu com a coluna muito intensamente, sendo necessário levar o gradiente de NaCl a aproximadamente 0,8 M para que a mesma se desliga, como pode ser observado pela figura 4.7. Porém, nesta concentração de NaCl a proteína precipitava irreversivelmente.

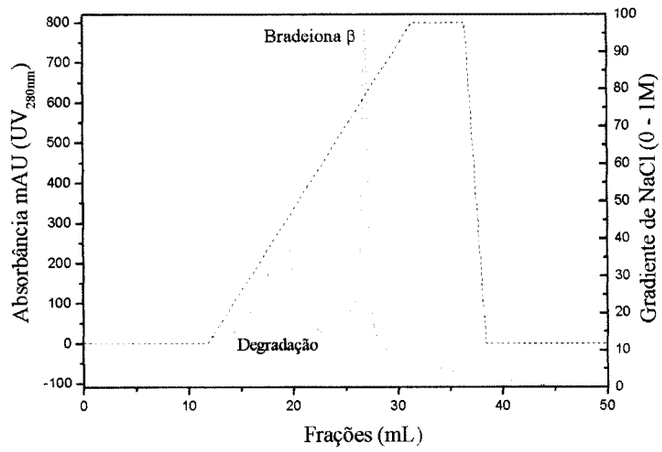


Figura 4.7: Perfil da cromatografia de troca iônica da Bradeiona β em resina Mono Q. Em azul: absorbância a 280 nm em função das frações coletadas (mL). Em pontilhado: gradiente de NaCl (0-1M). Fluxo de 1,0 mL/mim. Injeção: 1 mL de amostra. Tampão de eluição composto por 50 mM Tris-HCl, pH8,0, sob um gradiente de 0 a 1 M NaCl.

Com o conhecimento do resultado anterior, resolveu-se utilizar novamente uma cromatografia de troca iônica, porém desta vez modificando o pH da solução tampão de 8,0 para 6,5 com o intuito de diminuir a interação da proteína com a matriz. Assim, todas as frações eluidas da Superdex-200, correspondentes ao pico da Bradeiona β, foram reunidas em um único recipiente e submetidas a uma diálise para mudança de pH. A amostra inicial estava em tampão 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0. A proteína foi dialisada contra o tampão constituído de 100 mM NaCl, 50 mM MES, pH 6,5. Com a variação de pH de 8,0 para 6,5 verificou-se que quase a totalidade dos subprodutos da Bradeiona β (bandas adicionais) precipitavam, restando apenas a proteína de interesse (55 kDa) e baixos níveis de contaminantes entre 30-45 kDa. Assim, não foi necessária uma nova cromatografia e o resultado obtido após a diálise pode ser observado na figura 4.8.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

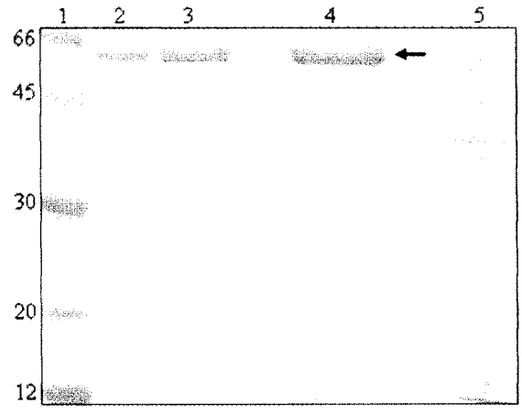


Figura 4.8: Bradeiona β após mudança de pH. Eletroforese (SDS-PAGE 15%) mostrando a proteína Bradeiona β após mudança de pH. **1**. Padrão de massa molecular (kDa). **2** a **4**. Bradeiona β solúvel em concentrações crescentes (~1,0 mg/mL, ~3,0 mg/mL e ~5,0 mg/mL, respectivamente). **5**. Subprodutos precipitados após diálise e centrifugação. A seta indica a proteína Bradeiona β (~55 kDa).

O sequenciamento do N-terminal (realizado no Centro de Química de proteínas – FMRP-USP) confirmou os cinco primeiros aminoácidos esperados para a seqüência primária da Bradeiona β recombinante (GILMD). O sequenciamento das bandas adicionais (veja figura 4.8, entre 30-45 kDa) mostrou o mesmo resultado obtido para a Bradeiona β. Assim, as razões para acreditarmos que a bandas adicionais (contaminantes) são oriundas do N-terminal da proteína Bradeiona β, e não contaminantes da linhagem bacteriana escolhida para expressão heteróloga, são: i) o fato que todos os subprodutos possuem massa molecular inferior a massa da proteína de fusão, ii) a instabilidade associada à septinas [5] e iii) a seqüência da região N-terminal dos contaminantes majoritários exibirem a mesma seqüência da Bradeiona β. A proteína Bradeiona β foi purificada contendo 0,25 ± 0,08 de nucleotídeo (1 GDP ou GTP para cada 4 moléculas de proteína) unido nas condições descritas (veja seção 3.9). O rendimento da purificação foi de aproximadamente 0,5 mg de proteína solúvel por litro de cultura. Este valor foi estimado, utilizando-se o coeficiente de extinção molar teórico e absorção em $\lambda = 280$ nm

(veja seção 3.3). Após a purificação, a Bradeiona β estava em um teor de pureza suficiente para utilização em análises com técnicas espectroscópicas, ensaios enzimáticos e testes de cristalização.

4.1.2 Análises estruturais

Dois distintos métodos foram utilizados para determinar a massa molecular do produto solúvel purificado após a retirada da GST da proteína de fusão. Analisados em conjunto, resultados de espalhamento dinâmico de luz e cromatografia de exclusão molecular indicam que a proteína Bradeiona β foi expressa como um oligômero estável, formado de no mínimo de dois monômeros. Na cromatografia de exclusão molecular (veja figura 4.6), a proteína eluiu como um único pico de massa molecular significativamente maior do que 116 kDa, a maior massa molecular usada como padrão. O monômero da proteína Bradeiona β possui uma massa molecular predita de aproximadamente 55 kDa, indicando que o oligômero é provavelmente maior que um dímero. Porém, oligomerização é esperada através do domínio *coiled-coil* C-terminal, resultando em uma molécula alongada que migra anomalamente na cromatografia de exclusão molecular. Portanto, é difícil obter uma conclusão definitiva apenas da cromatografia de exclusão molecular, exceto o fato esperado que a Bradeiona β não seja monomérica em solução. Este método aplicado não é o ideal para caracterizar a massa molecular da Bradeiona β, uma vez que a proteína é eluída no volume de exclusão da coluna.

O resultado obtido na análise da Bradeiona β com espalhamento dinâmico de luz está ilustrado na figura 4.9. O maior pico observado no resultado de DLS é centrado em um raio hidrodinâmico de 7 nm. Assumindo uma partícula esférica, este valor corresponde a massa molecular de 320 kDa (aproximadamente um hexâmero). Todavia, como existe pouca

informação disponível até o presente momento com respeito à forma molecular de oligômeros de septinas, esta estimativa apresentada deve ser tratada com algum cuidado. Contudo, é interessante notar que resultados similares descrevendo um hexâmero foram recentemente publicados por Sheffield e colaboradores para o hetero-oligômero formado pelas septinas SEPT2/6/7 [16]. O menor pico, também observado nos resultados de DLS, corresponde a aproximadamente 10% da massa total e está centrado em um raio hidrodinâmico de aproximadamente 35 nm. Isto provavelmente é um indicativo de formação de filamentos ou agregados, como também descritos para outras septinas [1,2,14,16]. O resultado de DLS também mostrou que nas condições analisadas a solução protéica apresentava-se praticamente monodispersiva (constituída de moléculas de mesmo tamanho).

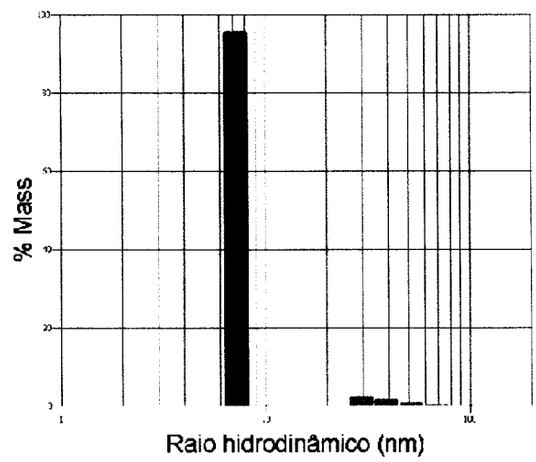


Figura 4.9: Análise da proteína Bradeiona β através de DLS. A proteína estava em uma concentração de aproximadamente 1,0 mg/mL (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8.0).

Muitos indícios indicam que o produto final, Bradeiona β, está corretamente enovelado. Estes incluem espectroscopia de dicroísmo circular, atividade catalítica, monosdispersividade e formação de cristais. O espectro de CD, ilustrado na figura 4.10, indica a presença de um alto conteúdo de hélices α na estrutura secundária, como evidenciado pela forte elipticidade negativa ao redor de 208 nm e 220 nm. Utilizando o programa de

desconvolução SELCON-3 [38] obtemos 39 ± 6% de hélice α, 25 ± 5% de folhas β e 36 ± 4% de estruturas irregulares. Não há relatos de análises de septinas através de espectroscopia de CD na literatura científica. Este fato pode ser decorrente da dificuldade de se obter septinas puras e estáveis em solução.

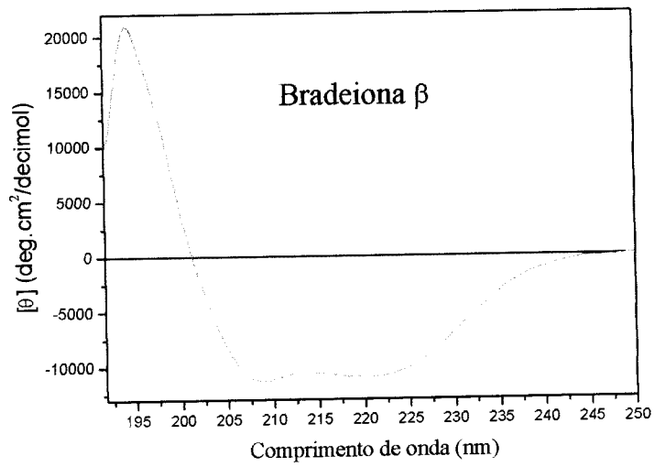


Figura 4.10: Espectro de dicroísmo circular da proteína Bradeiona β. A proteína (~4 μM) estava em tampão 25 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl, pH 8,0.

Septinas são relatadas na literatura como constituídas de um N-terminal variável, seguido por um domínio de ligação a GTP e finalizando em um domínio *coiled-coil* [7]. No caso da Bradeiona β, o domínio N-terminal é maior do que em muitas outras septinas (veja figura 1.3) e interessantemente possui uma alta percentagem de resíduos de prolina (14,3%). Na tabela 4.1, apresentamos os resultados de predição de estrutura secundária, utilizando o programa PSIPRED, obtidos na análise da seqüência de aminoácidos da Bradeiona β.

	Hélice α (%)	**Folhas β (%)**	***Coil* (%)**
Bradeiona β	36,4	10,7	52,9
FC	18,4	0	81,6
DGTPase	40,3	18,7	41
Coiled-coil	46,8	0	53,2

Tabela 4.1: Predição de estrutura secundária da proteína Bradeiona β e de seus domínios estruturais através do programa PSIPRED [42]. Em azul, destaque para a alta porcentagem de estruturas não regulares no domínio N-terminal (FC).

O programa de predição de estrutura secundária PSIPRED [42] prediz que o FC possui aproximadamente 82% de estruturas não regulares. Com base na comparação com a estrutura de outras GTPases, o domínio GTPase da Bradeiona β é esperado conter uma mistura de estruturas α/β. Tais domínios, em pequenas GTPases por exemplo, tipicamente possuem aproximadamente 40% de hélices α e 30% de folhas β [9]. Em certa concordância, a predição de estrutura secundária resultou 40% de hélices α, 19% de folhas β e 41% de estruturas não regulares para o domínio GTPase da Bradeiona β. A região C-terminal (416-478) inclui uma curta região interrompida por repetidos resíduos de leucina/isoleucina a cada sete resíduos de aminoácidos [7,11], a qual é esperada formar uma estrutura *coiled-coil*, como sugerido para outras septinas. Domínios *coiled-coil*, geralmente, são formados por duas longas hélices α cuja dimerização é medida, em parte, através dos resíduos de leucinas. A predição de estrutura secundária prediz 47% de hélices α na região C-terminal da Bradeiona β (veja tabela 4.1).

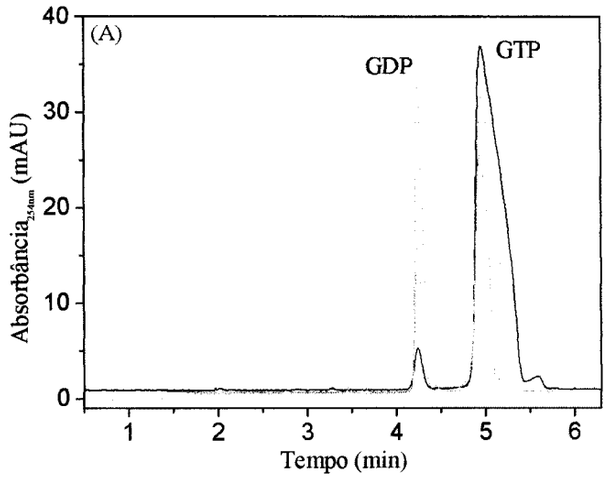
A estrutura secundária da proteína Bradeiona β é, portanto, segundo os resultados de predição composta por aproximadamente 36% de hélices α, 11% de folhas β e 53% de estruturas não ordenadas. O resultado de desconvolução apresenta uma boa concordância com respeito ao conteúdo de hélices α (39 ± 6 %), porém mostra uma diferença nas quantidades de folhas β e estruturas não regulares. No entanto, os resultados obtidos com os dois métodos são

consistentes com o fato do espectro de CD observado experimentalmente ser dominado por hélices α.

4.1.3 Atividade GTPase

Uma das razões para o lento progresso no estudo de septinas é a falta de um técnica robusta, rápida e simples para a medida da atividade GTPase. A maioria das análises comumente são acometidas de uma série de dificuldades práticas, devido à necessidade de utilização de nucleotídeos radioativos. O método alternativo descrito aqui é baseado no uso de eletroforese capilar para separar e quantificar o substrato e o produto da hidrólise resultante de uma reação enzimática, após a mesma ter sido interrompida pelo congelamento em nitrogênio líquido. Esta técnica requer pequenas quantidades de amostra e produz mínimos resíduos de produto final. Ótimas separações foram obtidas utilizando o tampão de corrida composto de 10 mM MES, pH 6,5. GTP e GDP foram identificados através dos tempos de migração, em comparação com padrões previamente definidos e pelos espectros de absorção.

Típicos eletroferogramas mostrando a separação de GTP e GDP estão ilustrados na figura 4.11. A figura 4.11(A) foi obtida utilizando capilar sem recobrimento interno e aplicação de potencial positivo na extremidade de introdução da amostra. A figura 4.11 (B) foi obtida utilizando capilar com recobrimento interno de PVA e aplicação de potencial negativo. Ambos os métodos apresentaram boa separação das espécies analisadas. Porém, o método com capilar recoberto foi mais reprodutível e rápido. Com a utilização de capilares recobertos de PVA, os picos correspondentes ao GTP e GDP foram resolvidos em aproximadamente 2 minutos, com um tempo total de análise menor do que 10 min (incluindo o pré-condicionamento do capilar, injeção da amostra e a separação eletroforética).



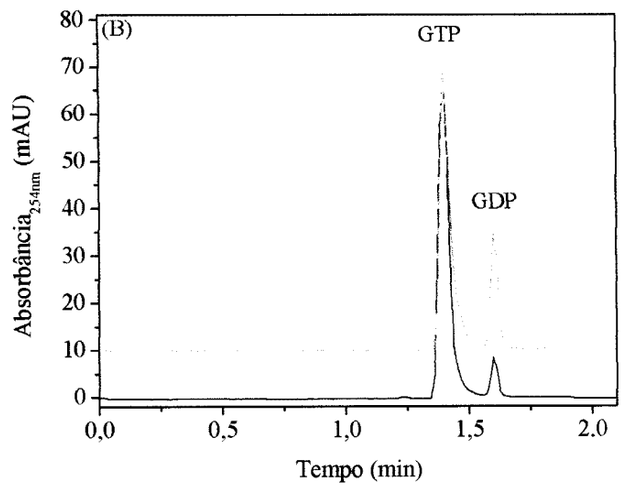


Figura 4.11: Separação de GTP e GDP por eletroforese capilar, após hidrólise enzimática. **(A)** Método de análise em capilar sem recobrimento interno (capilar com 50 cm de comprimento e 50 μm de diâmetro interno; V = +28 kV;). GTP (5mM) foi incubado com Bradeiona β (2 μM) na ausência de Mg^{2+} (negro), durante 2 h na presença de 1 mM de Mg^{2+} (vermelho) e durante 9 h na presença de 1 mM de Mg^{2+} (azul). **(B)** Método de análise em capilar com recobrimento interno de PVA (capilar com 50 cm de comprimento e 50 μm de diâmetro interno; V = -28 kV). GTP (4 mM) foi incubado com Bradeiona β (2 μM) durante 10 min (negro) e 5 h (vermelho) na presença de 1 mM de Mg^{2+}. O tampão de corrida utilizado foi MES 25 mM, pH 6,5 em ambos os casos. A temperatura de incubação das reações foi de 28°C.

O papel da atividade GTPase na função biológica de septinas apresenta-se como um dos mais desafiantes problemas na bioquímica de septinas e somente um limitado número de estudos foram realizados para tentar elucidar o papel da ligação e hidrólise de nucleotídeo *in vivo*. Além disso, constantes cinéticas para hidrólise de GTP por septinas são efetivamente ausentes na literatura científica. Contudo, esforços estão sendo realizados para reproduzir *in vivo* condições para tentar entender a relação entre atividade GTPase, associação com a membrana, formação de filamentos e ultimamente o envolvimento de septinas em diversos processos celulares como exocitose e citocinese [5,26,27]. Com respeito ao problema da associação para formação de filamentos, há um pequeno consenso com respeito ao papel da ligação do GTP e/ou hidrólise para inúmeros membros da família de septinas [5,16]. Por outro lado, é verificado que a ligação e hidrólise de GTP reduz significativamente a afinidade da proteína SEPT4/H5 [13] por fosfolipídios de membrana (PtdIns(4,5)P_2).

Similarmente a outras septinas, a proteína Bradeiona β apresenta em sua seqüência primária o motivo *P-loop* ou *Walker A Box*, referente aos resíduos 151-158 (**GESGLGKS**), também conhecido como motivo G1. Outros dois motivos característicos de proteínas de ligação a GTP estão presentes: o motivo G3 e o motivo G4 referentes aos resíduos 239-242 (**DESG**) e 289-292 (**AKAD**) [11], respectivamente. A presença de motivos como estes, em geral, apresentam-se como uma impressão digital indicando a possível atividade biológica da proteína, porém requer validação. Assim, eletroforese capilar foi então utilizada com a finalidade de comprovar a atividade GTPase da proteína Bradeiona β. Exemplos de gráficos ilustrando a produção de GDP em função do tempo e o ajuste dos pontos iniciais para determinação da velocidade inicial (v_0) da reação estão mostrados na figura 4.12(A). O gráfico de Michaelis-Menten obtido para a Bradeiona β, na presença de 1 mM de Mg^{2+}, é apresentado na figura 4.12(B).

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

GDP foi evidentemente produzido como resultado da hidrólise do GTP pela proteína (veja figura 4.12), demonstrando pela primeira vez que a septina humana Bradeiona β possui atividade catalítica. Além disso, o resultado obtido sugere que a catálise e liberação do produto (dissociação do GDP) ocorrem na ausência de adicionais proteínas auxiliares *in vitro* (com uma taxa mensurável em uma escala de tempo da ordem de minutos/horas). Isto é consistente com o fato que fatores de troca de nucleotídeo de guanina nunca foram descritos na literatura científica no caso de septinas [55]. Na ausência de Bradeiona β, a taxa de hidrólise espontânea do GTP mostrou-se ser efetivamente desprezível, com um nível constante de GDP observado devido à contaminação presente no GTP comercial utilizado. Controles realizados em todos os casos analisados, comprovam que a proteína após ser congelada em nitrogênio liquido e descongelada, não apresentava mais atividade GTPase.

As constantes cinéticas determinadas nesta seção somente serão válidas se a proteína Bradeiona β possuir um comportamento que possa ser modelado pela cinética de Michaelis-Menten. Por analogia com outras GTPases, existe uma grande possibilidade que o GDP resultante da hidrólise do GTP, permaneça um período relativamente longo dentro do sítio ativo da proteína, em outras palavras, que a taxa de dissociação seja lenta. Esta suposição acarreta que a constante de reação k_{-2} não é mais desprezível, impossibilitando a utilização da cinética de Michaelis-Menten. Estudos adicionais para determinação da taxa de dissociação do GDP (no caso da Bradeiona β) seriam necessários para elucidar está questão. Assim, nas análises futuras consideraremos que o constante k_{-2} é desprezível ($k_{-2} << k_2$).

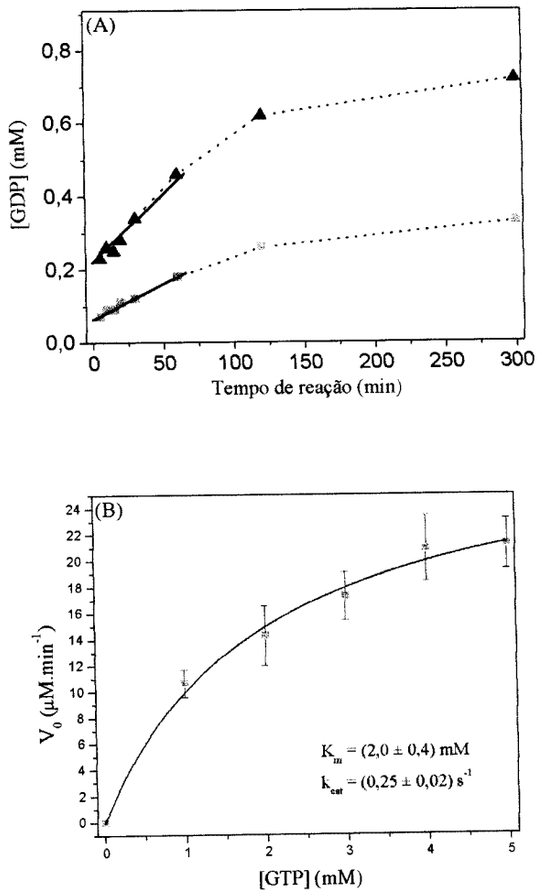


Figura 4.12: **(A)** Determinação da velocidade inicial através do ajuste dos pontos inicias da curva de hidrólise de GTP no decorrer do tempo. Em vermelho: reação formada de 1 mM de GTP, 1 mM de $MgCl_2$ e 1 μM de Bradeiona β. Em preto: reação formada de 4 mM de GTP, 1 mM de $MgCl_2$ e 1 μM de Bradeiona β. **(B)** Gráfico de Michaelis-Menten (Bradeiona β – GTP). O ajuste foi realizado utilizando o programa Origin 7.0. As barras de erros foram obtidas através da regressão linear realizada nos pontos inicias de cada curva (Origin 7.0).

O ajuste da hipérbole retangular realizado nos pontos experimentais (figura 4.12) forneceu os seguintes parâmetros cinéticos: K_m = (2,0±0,4) mM e k_{cat} = (0,25±0,02) s^{-1}. O último valor foi determinado através do quociente da velocidade máxima (V_{max}) pela concentração enzimática do número de sítios ativos, ou seja, a concentração monomérica. O valor de k_{cat} determinado para a Bradeiona β mostra que a enzima apresenta uma rápida taxa

intrínseca de hidrólise de GTP quando comparada com pequenas GTPases como Ras e Rab5, as quais dependem de proteínas de ativação (GAPs) para a hidrólise. Resultados na literatura mostram que a proteína de fusão GST-SEPT2 de camundongo, também hidrolisa e troca GTP rapidamente [29]. Em comparação, os valores das constantes de taxas intrínsecas (k_{cat}) das proteínas Ras e Rab5 são 4,7 x 10^{-4} e 3,3 x 10^{-3} s^{-1} respectivamente [56,57], porém estes valores podem aumentar cinco ordens de grandeza na presença das respectivas GAPs [58]. A taxa intrínseca de hidrólise de GTP pela Bradeiona β é portanto, um valor intermediário entre a constante de taxa ativada (na presença de fatores auxiliares) e a constante de taxa intrínseca, apresentada por pequenas GTPases. Outras GTPases como FtsZ e Tubulina [24,59] por exemplo, as quais similarmente às septinas formam filamentos, hidrolisam o GTP e dissociam o GDP no contato dos monômeros no próprio filamento na ausência de fatores auxiliares. Contudo, a possível existência de fatores de troca e/ou proteínas de ativação podem afetar significativamente a cinética de hidrólise de GTP pela Bradeiona β e outras septinas *in vivo*.

Um fator que afeta a hidrólise de GTP pela Bradeiona β é a concentração de íons Mg^{2+} e esta característica é verificada para a atividade GTPase de todas as septinas que foram experimentalmente analisadas. Embora muitas pequenas GTPases, como a proteína Ras, sejam dependentes de Mg^{2+} para ligação ao GTP, esta condição não é necessária para as proteínas Rho ou Cdc42 [20,60]. A figura 4.13 mostra que a presença de Mg^{2+} foi essencial para a hidrólise de GTP pela Bradeiona β. Porém, com uma concentração de 5 mM de Mg^{2+} verificamos uma queda acentuada na hidrólise de GTP, indicando que a enzima foi inibida a está concentração. Para as concentrações de íons Mg^{2+} de 0,25 mM, 1 mM, 2,5 mM e 5 mM as velocidade inicias das reações (v_0) foram 3.0 μM/min, 7.6 μM/min, 12.8 μM/min e 5.9 μM/min, respectivamente (veja figura 4.13(B)).

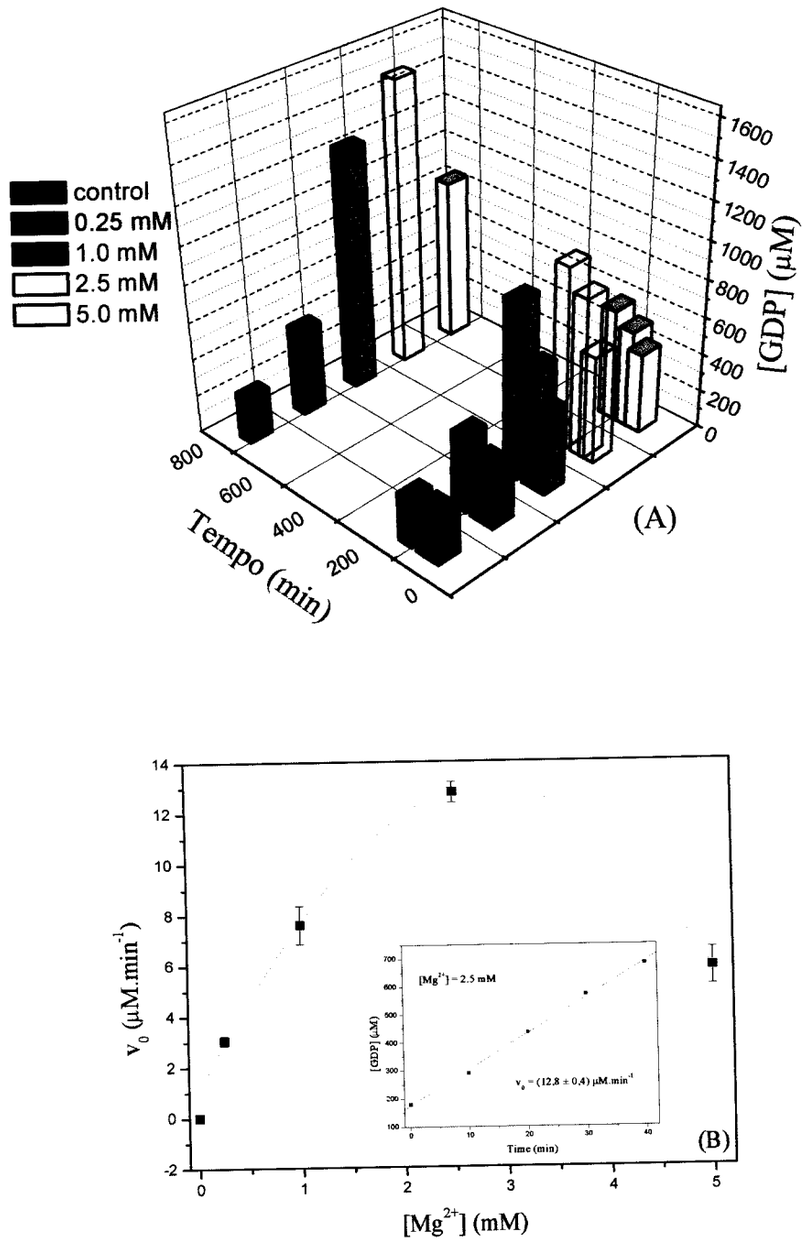


Figura 4.13: Reação de hidrólise de GTP em função da concentração de íons Mg^{2+}. Em preto: ausência de íons Mg^{2+}. Em azul: 1 mM de íons Mg^{2+}. Em verde: 2,5 mM de íons Mg^{2+}. Em azul: 5 mM de íons Mg^{2+}. Em todos os casos a concentração de GTP utilizada foi de 5 mM e a concentração de Bradeiona β foi de 2 μM.

A dissociação do GDP é inibida por Mg^{2+} em muitas proteínas da subfamília de pequenas GTPases Ras (Ras-*like*) [21]. O mesmo fenômeno é observado para a pequena GTPase Rab5 [21]. A adição de 5 mM de Mg^{2+} bloqueia completamente a dissociação do GDP, enquanto para a concentração de 0,5 mM o efeito é muito pequeno [21]. O efeito de inibição começa a ser considerável em concentrações de íons Mg^{2+} superiores a 1,5 mM. O resíduo Ser34 da proteína Rab5 é responsável por coordenar o íon Mg^{2+} no sítio de ligação do nucleotídeo de guanina. A mutante RabS34N apresentou uma taxa de dissociação muito maior que a taxa de dissociação do Rab nativa (0,245 contra 0,006 min^{-1}) [21]. Porém, o fato mais importante é que a taxa de dissociação de GDP apresentada pela mutante RabS34N não é mais afetada pela concentração de íons Mg^{2+} [21]. Comportamento similar é apresentado pela mutante RasS17A, que mostrou uma taxa de dissociação de GDP acelerada e insensível à concentração de Mg^{2+}. Uma provável explicação para o observado é que a coordenação do Mg^{2+} pela Ser34 participe em um impedimento químico que impeça a dissociação do nucleotídeo. Contudo, é também possível que o Mg^{2+} promova um rearranjo estrutural na proteína Rab5 através de interações com a Ser34 que seja desfavorável para a dissociação do GDP [21].

Estimativas da concentração intracelular de Mg^{2+} mostram uma significante variação de tecido para tecido, com valores típicos no intervalo de 0,2-1,5 mM [61], sugestionando que a concentração de Mg^{2+} utilizada em nossos experimentos é provavelmente fisiologicamente relevante. Considerando que a concentração de Mg^{2+} utilizada ligue-se ao GTP, a inibição observada a altas concentrações pode ser devida provavelmente a dois fenômenos: i) à afinidade intrínseca da enzima pelo metal, ocasionando um impedimento estérico ou repulsão eletrostática do substrato ou alternativamente ii) devido à baixa dissociação do GDP [21].

Estudos mais detalhados do comportamento da atividade GTPase em função da concentração de íons Mg^{2+} para a fusão GST+DGTPase (144-416) serão descritos na seção 4.3.

3.1.4 Cristalização

Cristais de Bradeiona β na forma de placas com dimensões de aproximadamente 0,3 mm foram obtidos, a 4°C, através da técnica de difusão de vapor (*hanging drop*) em aproximadamente dois meses. Cada gota era composta de uma razão de 1:1 de solução estoque de proteína (10 mg/mL) e solução do reservatório. Os cristais na forma de placas foram obtidos nas condições compostas de 0,1 M Tris-HCl, pH 8.0, 10% PEG6000 e 0,1 M Bicina, pH 9,0, 10% w/v PG6000 (solução do poço). Também houve a formação de cristais de Bradeiona β na forma de agulhas na condição composta de 0,1 M Ácido citríco, pH 5,0, 10% w/v PG6000, 4°C. Microcristais foram obtidos na condição 0,1 M MES, pH 6,0, 5% w/v PG6000, 4°C. Os cristais de Bradeiona β obtidos estão ilustrados na figura 4.14. Os cristais maiores (na forma de placas) foram subsequentemente congelados em nitrogênio líquido, na presença de 20% de glicerol (crio - protetor). Os melhores cristais difrataram a uma máxima resolução de 6,0 Å em uma fonte de raios X com anodo rotatório. O padrão de difração (característico de proteínas) de um dos cristais testados está ilustrado na figura 4.15(A).

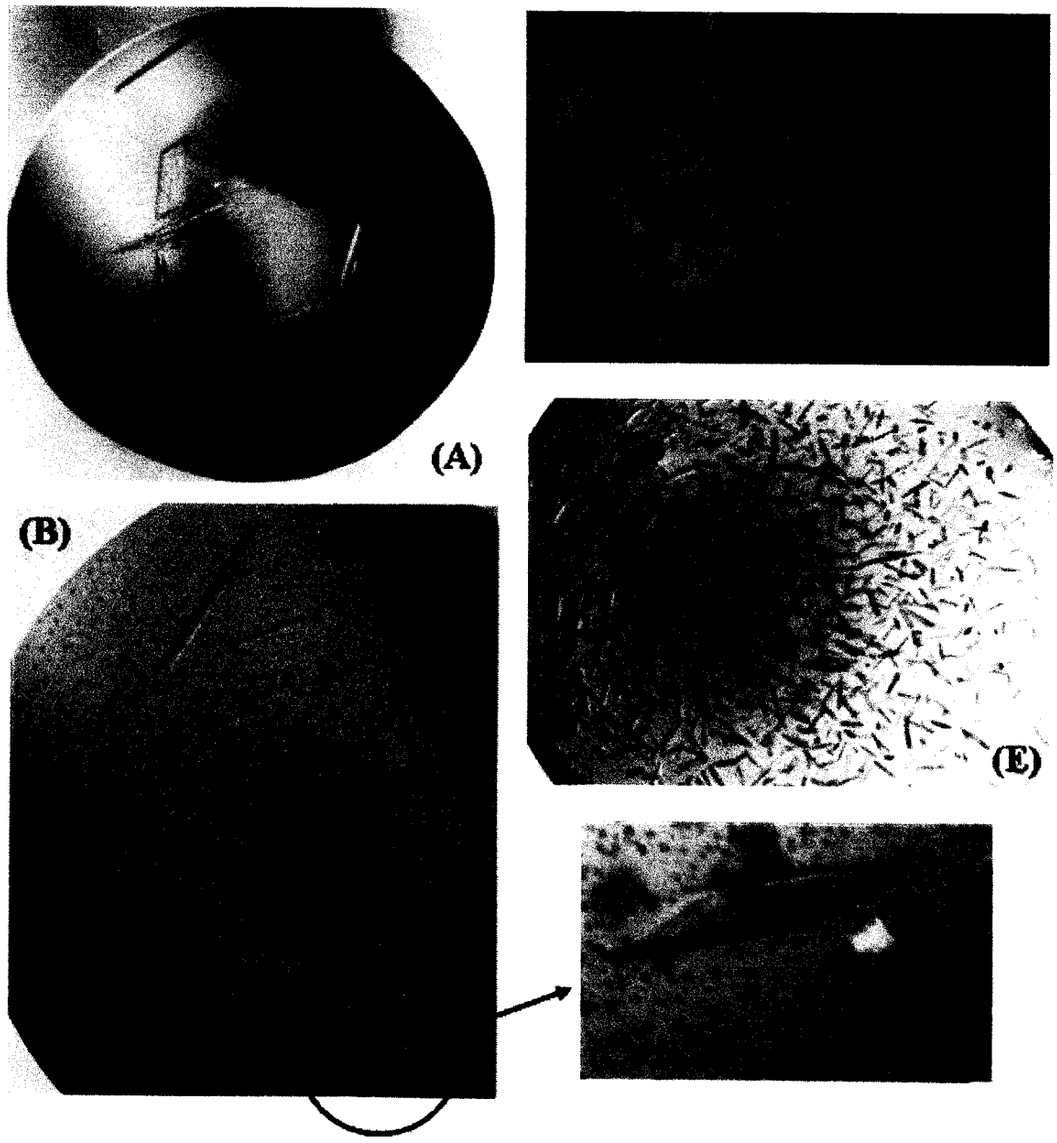
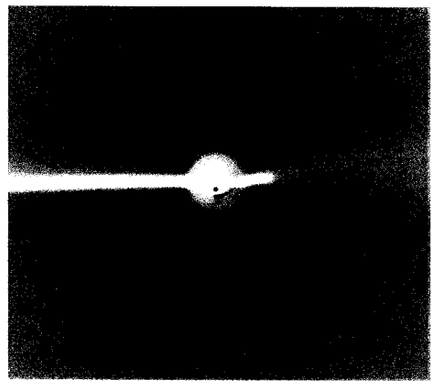


Figura 4.14: Cristalização da septina Bradeiona β. **(A)** Cristais de Bradeiona β, na forma de placas, obtidos a 4°C pelo método de difusão de vapor (0,1 M Tris, pH 8,0, 10% w/v PG6000). **(B)** Cristais de Bradeiona β, na forma de placas, obtidos a 4°C (0,1 M Bicina, pH 9,0, 10% w/v PG6000). **(C)** Imagem ampliada de dois cristais de Bradeiona β. O cristal maior foi preparado convenientemente e analisado por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 15%). **(D)** Cristais de Bradeiona β na forma de agulhas, 4°C (0,1 M Ácido citríco, pH 5,0, 10% w/v PG6000). **(E)** Microcristais de Bradeiona β, 4°C (0,1 M MES, pH 6,0, 5% w/v PG6000).

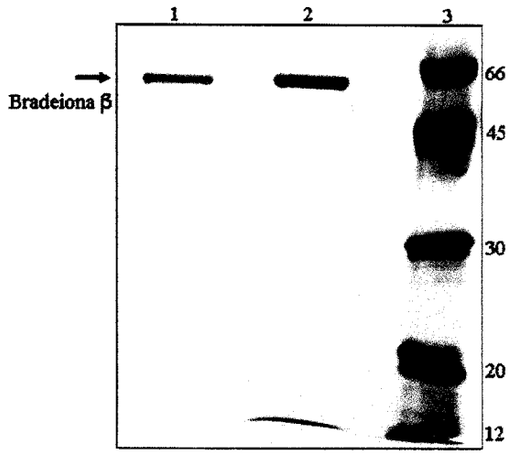
Para verificar a homogeneidade do material cristalizado, com o conhecimento prévio da presença de baixos níveis de contaminantes no material inicial (veja figura 4.8, banda com

massa molecular entre 38-42 kDa aproximadamente), dois cristais foram previamente lavados com um tampão contendo crio – protetor (20% glicerol) e submetidos a análise por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 15%) e subsequentemente corados com prata. Uma única banda foi observada com aproximadamente 55 kDa, correspondente a massa molecular da proteína Bradeiona β intacta, indicando que o processo de cristalização efetivamente representou o passo final na purificação. O resultado da eletroforese está ilustrado na figura 4.15(B).

Estudos recentes destacam que uma das chaves para compreender a bioquímica de septinas é a obtenção de informações moleculares detalhadas em nível estrutural [5,16]. Há uma total ausência de estruturas tridimensionais completas de septinas ou de seus domínios na literatura científica. Portanto, não existem informações a respeito de como a ligação e hidrólise do GTP podem afetar as estruturas tridimensionais de septinas. Por outro lado, está sensível regulação é conhecida por ser crítica para a compreensão do funcionamento de outras GTPases. Os cristais de Bradeiona β obtidos, por enquanto, não possibilitaram a obtenção de resultados estruturais. Porém, estes cristais inéditos abrem perspectivas para uma futura determinação da estrutura tridimensional da proteína Bradeiona β, ou seja, a estrutura da primeira proteína da família septina.



(A)



(B)

Figura 4.15: Análise dos cristais de Bradeiona β obtidos. **(A)** Padrão de difração de um cristal de Bradeiona β. O cristal difratou a uma máxima resolução de 6,0 Å em uma fonte de raios X com anodo rotatório. **(B)** Cristais de Bradeiona β analisados por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 15%) e posteriormente corado com prata. A seta indica a Bradeiona β (~55 kDa).

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

4.2 Fragmento Conservado (FC)

A estrutura composta de três domínios atribuídos a septinas foi amplamente discutida em seções anteriores. Dois desses domínios, FC e DGTPase, foram delimitados e produzidos heterologamente em *E. coli* para subseqüente caracterização. O Fragmento Conservado (N-terminal) representa os 119 aminoácidos inicias idênticos entre as proteínas Bradeiona α e β, indicando que esta região pode ser um domínio comum entre as duas proteínas. Os resultados experimentais de caracterização do FC serão apresentados nesta seção. Resultados de caracterização do domínio GTPase serão apresentados na seção 4.3.

4.2.1 Subclonagem, expressão e purificação

A região codificante do Fragmento Conservado (FC) foi amplificada através da técnica de PCR utilizando como molde inicial o plasmídeo cedido pela Dra. Tanaka, e subclonado em dois distintos vetores de expressão bacteriano: pGEX-5X-1 e pET28a(+). Utilizou-se para a polimerização, em ambos os casos, a enzima Pfx DNA polimerse que possui atividade corretiva dos nucleotídeos que incorpora. Os transformantes positivos, em ambos os casos, foram confirmados através da técnica de PCR de colônia (veja subseção 4.1.2). A figura 4.16(A) e (B) mostra os resultados dos produtos de PCR com bandas de aproximadamente 360 pb referentes a região que codifica o FC. O resultado do PCR de colônia para o sistema pGEX-5X-1, pode ser visualizado na figura 4.16(C). Resultados similares de análise por PCR de colônia foram obtidos para o sistema pET28a(+).

Os sequenciamentos confirmaram as subclonagens das regiões codificantes do FC dentro do correto quadro de leitura dos vetores, em ambos os casos, e um dos clones positivos para cada construção foi selecionado para testes de expressão (**pGEX-BradFC** e **pET-CF**). Após a transformação de células de *E. coli* AD202 competentes com o clone positivo **pGEX-BradFC**, foram realizados ensaios de expressão e purificação nas mesmas condições pré-estabelecidas para a proteína recombinante Bradeiona β. Na figura 4.17(A) observamos bandas adicionais de expressão com intensidades crescentes com o decorrer do tempo, referentes à proteína de fusão com massa molecular de aproximadamente 40 kDa (GST + FC).

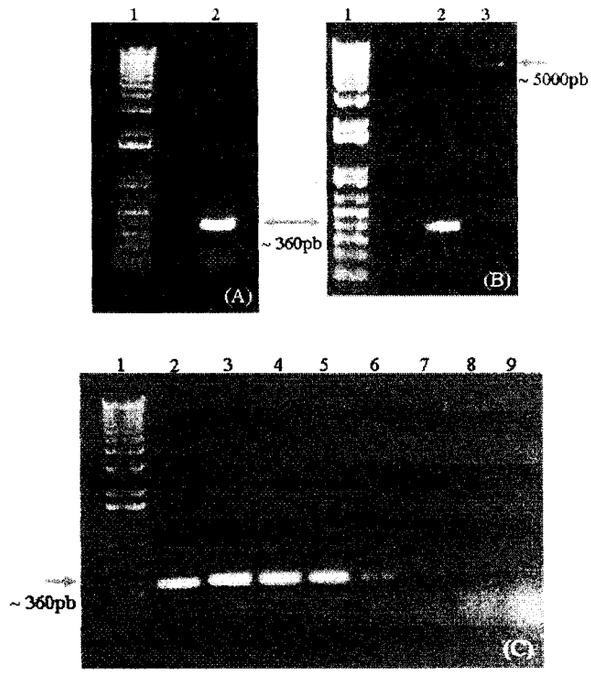


Figura 4.16: Amplificação da região codificante do FC e confirmação dos clones positivos através de PCR de colônia. **A)** Gel de agarose (0,8 % TAE) do produto de PCR para subclonagem no vetor pGEX-5X-1. **1**. Padrão de massa molecular (1 kb Plus/Promega). **2**. Produto de PCR mostrado uma banda de aproximadamente 360 pb referente ao gene do FC. **B)** Gel de agarose (0,8 % TAE) do produto de PCR para subclonagem no vetor pET28a. **1**. Padrão de massa molecular. **2**. Produto de PCR com uma banda de aproximadamente 360 pb referente a região codificante do FC. **3.** Vetor de expressão bacteriano pET28a linearizado. **C)** Gel de agarose (0,8 % TAE) do produto de PCR de colônia (sistema pGEX-5X-1). **1**. Padrão de massa molecular. **2** a **9**. Produto de PCR de colônia dos transformantes.

Empregamos novamente a opção de clivar a proteína de fusão ainda ligada à resina. Na figura 4.17(B) podemos visualizar o FC recombinante após clivagem na resina e verificar a presença de um contaminante de massa molecular superior a 66 kDa (colunas 4 e 5), similarmente ao que ocorria na purificação da Bradeiona β. Porém, neste caso, não tínhamos o padrão de inúmeras bandas que ocorriam no caso anterior. Como os métodos de expressão e purificação utilizados foram os mesmos, este fato reforça a nossa hipótese de degradação e/ou terminação precoce da transcrição, discutido anteriormente (seção 4.1).

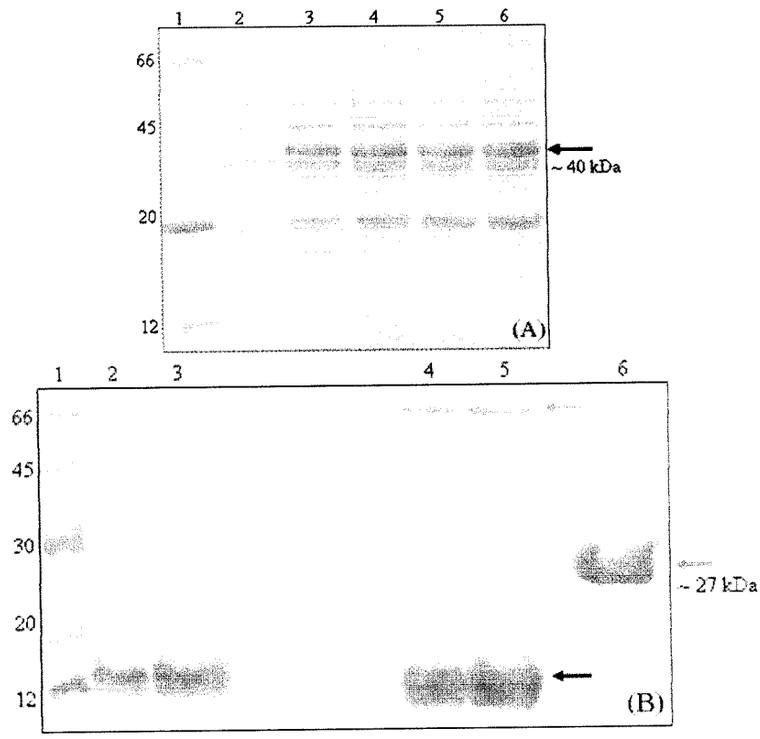


Figura 4.17: Expressão e purificação do FC. **(A)** Expressão da proteína de fusão (GST+FC). SDS-PAGE 15% ilustrando extratos totais de *E. coli* AD202 durante 10 h de indução com IPTG a 20°C. **1**. Padrão de massa molecular. **2**. Cultura não induzida (t_0). **3** a **6**. Cultura induzida a 20°C durante 2h (t_1), 4h (t_2), 6h (t_3) e 8h (t_4), respectivamente. **(B)** SDS-PAGE 15% mostrando a lavagem da resina após a clivagem com a enzima Fator Xa. **1**. Padrão de massa molecular. **4** e **5**. Amostra da lavagem da resina após clivagem. **2** a **3**. Alíquotas das frações eluidas após cromatografia de exclusão molecular (Superdex-75). **6**. Proteína GST que ficou ligada a resina após clivagem e subsequentemente eluida com GSH (seta azul, ~27 kDa). A seta vermelha indica o contaminante (acima de 66 kDa). A seta preta indica o FC.

Na coluna 6 da figura 4.17(B) podemos visualizar a proteína GST que ficou ligada à resina após clivagem e foi posteriormente eluída com tampão A acrescido de GSH (10 mM). Para separar o FC do contaminante, optamos em utilizar uma cromatografia de exclusão molecular na coluna Superdex-75. A figura 4.17 (colunas 2 e 3) mostra o FC isolado do contaminante após a etapa de exclusão molecular. O perfil da cromatografia de exclusão molecular realizada está exibido na figura 4.18. O FC eluíu aproximadamente na mesma fração de eluição da proteína Citocromo c que possui massa molecular de 12,4 kDa.

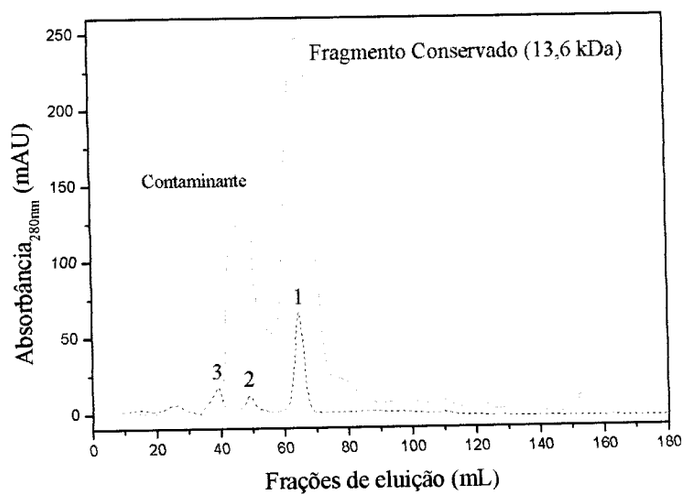


Figura 4.18: Perfil da cromatografia de exclusão molecular (Superdex-75 preparativa) do Fragmento Conservado. Em vermelho: absorbância a 280 nm em função das frações coletadas (mL). Em pontilhado: padrão de massa molecular analisados sob as mesmas que o FC. **1**. Citocromo c (12,4 kDa). **2**. Anidrase carbônica (30 kDa). **3**. Soroalbumina bovina (66 kDa).

O rendimento da purificação foi de aproximadamente 3 mg de proteína solúvel (sem GST) por litro de cultura. Este valor foi estimado, utilizando-se o coeficiente de extinção molar teórico e absorção óptica em λ = 280 nm (veja seção 3.3). O sistema pGEX-5X-1 permitiu a obtenção do FC solúvel porém, o rendimento do processo era baixo considerando a

quantidade de material biológico necessário para testes de cristalização, possíveis estudos da estrutura por ressonância magnética nuclear (RMN) e análises espectroscópicas. Assim, resolvemos utilizar um outro sistema de expressão (pET28a) que permitisse um maior rendimento.

A expressão do FC com o plasmídeo **pET28-FC** foi realizada a 37°C durante 4h. Após os passos de expressão e lise bacteriana, a proteína de fusão (6xHis+FC) foi isolada através de cromatografia de afinidade empregando uma resina de níquel (Ni-NTA). As frações eluídas foram analisadas por eletroforese (SDS-PAGE 15%) como podemos verificar na figura 4.19. As frações eluídas (figura 4.19, colunas de 6-10) foram concentradas em centriprep de 3 kDa e tiveram o tampão trocado para tampão PBS pH 7,4, porque este confere melhor ambiente para atividade da protease Trombina que será utilizada posteriormente para separar a cauda com histidinas do FC. Subsequentemente a etapa de diálise (em membrana com corte de 3kDa), a clivagem da cauda de histidinas foi realizada como descrito na subseção 3.3.3.

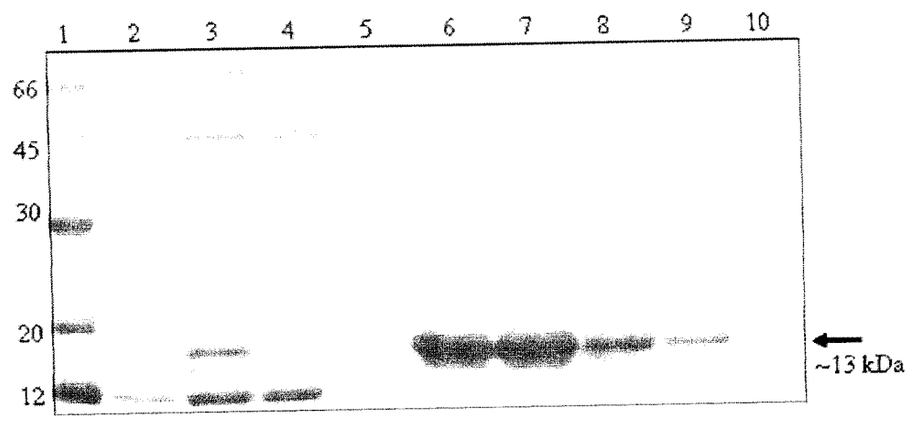
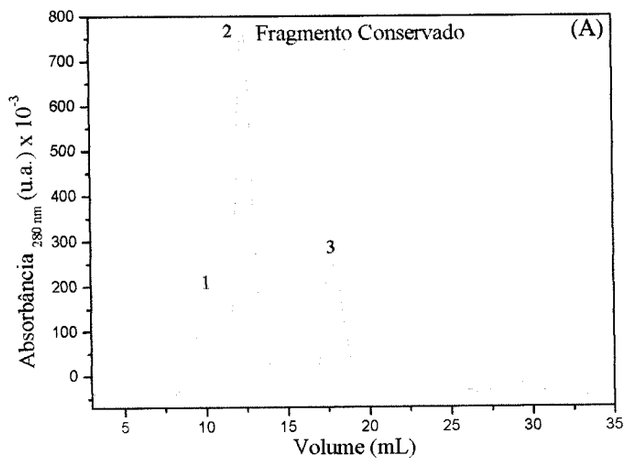


Figura 4.19: Purificação do FC em coluna Ni-NTA. Eletroforese (SDS-PAGE 15%). **1.** Padrão de massa molecular. **2.** Fração insolúvel. **3.** Fração solúvel (entrada da resina de níquel). **4.** Saída da resina de níquel (Ni-NTA). **5** a **9**. Eluições da proteína de fusão 6xHis+FC com 100 mM de imidazol (ver seta).

Após as etapas de cromatografia de afinidade e clivagem da cauda com histidinas, realizamos um passo final de purificação através de uma cromatografia de exclusão molecular na coluna Superdex-75. O resultado da cromatografia de exclusão molecular está ilustrado na figura 4.20(A).



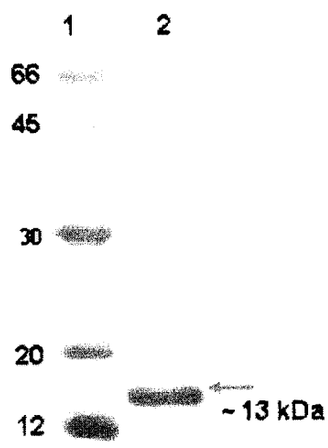


Figura 4.20: Purificação do FC recombinante. **(A)** Cromatografia de exclusão molecular na coluna Superdex-75. **1.** Contaminante. **2.** Fragmento conservado. **3.** Cauda com histidinas (6xHis). **(B)** Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 15%). Fragmento conservado após as etapas de purificação. **1.** Padrão de massa molecular (kDa). **2.** Fragmento conservado (~13,6 kDa) após clivagem com Trombina e gel filtração para retirada da cauda com histidinas.

Finalmente, uma alíquota da fração de eluição do FC na Superdex-75 foi convenientemente preparada e submetida a uma análise em eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 15%). O resultado da análise pode ser visualizado na figura 4.20(B). O rendimento da purificação foi de aproximadamente 10 mg de proteína solúvel por litro de cultura, mais de três vezes superior ao rendimento obtido com a construção no vetor pGEX-5X-1. Após a purificação, em ambos os casos, o FC estava em um teor de pureza suficiente para análises futuras.

4.2.2 Análises estruturais

Os resultados de cromatografia de exclusão molecular e DLS sugestionam que o FC foi produzido como um monômero estável. Na cromatografia de exclusão molecular (veja figura 4.18), o FC que possui massa de 13,6 kDa eluiu como um único pico de massa molecular próxima a 12,4 kDa (massa do Citocromo c utilizado como padrão). O resultado obtido na análise do FC através de DLS está ilustrado na figura 4.21. O único pico (indicando uma solução monodispersa) observado está centrado em um raio hidrodinâmico de 2,3 nm. Assumindo uma partícula esférica, este valor corresponde a massa molecular de 23 kDa. Este valor está acima do valor predito para um monômero de FC (13,6 kDa), indicando a presença de um dímero ou uma partícula não esférica. Uma partícula alongada resultaria em um maior raio hidrodinâmico, consequentemente em uma super-estimação de sua massa. A predição de estrutura secundária (veja tabela 4.1) prediz que o FC possui uma estrutura não regular, indicando uma molécula alongada sem estrutura compacta (não esférica).

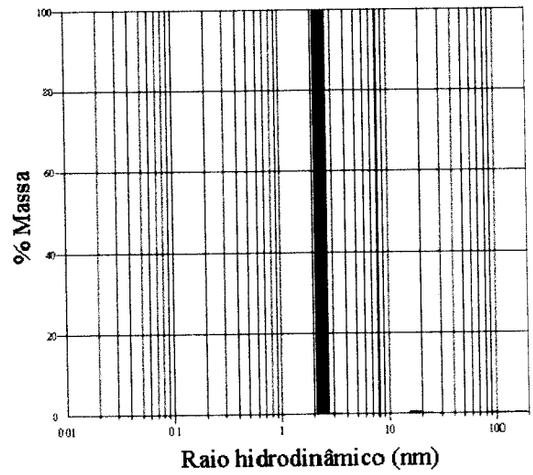


Figura 4.21: Análise do Fragmento Conservado através de DLS. FC (~1,0 mg/mL) em tampão 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0.

O espectro de CD obtido para o FC está ilustrado na figura 4.22. Analisando o espectro verificamos a existência de um único mínimo próximo a λ = 201 nm, característico de proteínas que apresentam basicamente estruturas irregulares.

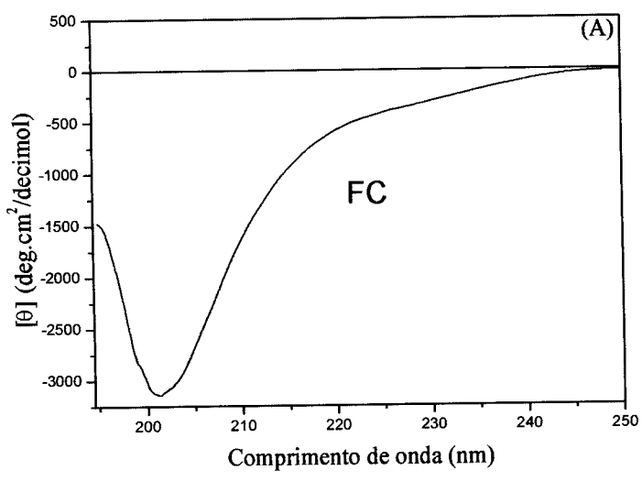


Figura 4.22: Espectro de dicroísmo circular do FC. FC (7 μM) em tampão 25 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl, pH 8,0.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

Analisando o espectro de emissão de fluorescência do FC ilustrado na figura 3.23, verificamos um máximo de emissão em λ = 356 nm, típico de resíduos de triptofanos altamente expostos ao solvente. Este resultado indica que os três triptofanos da seqüência de aminoácidos do FC (veja tabela 3.1) estão possivelmente expostos ao solvente, reforçando a hipótese de que o FC possui uma estrutura secundária irregular.

Para averiguar a estrutura secundária do FC, utilizamos espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Medidas RMN (unidimensional) foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS), utilizando um espectrômetro Varian Inova, operando a 14,1 T (600 MHz). Foram realizados experimentos H-1D a 20°C em pH 7,0.

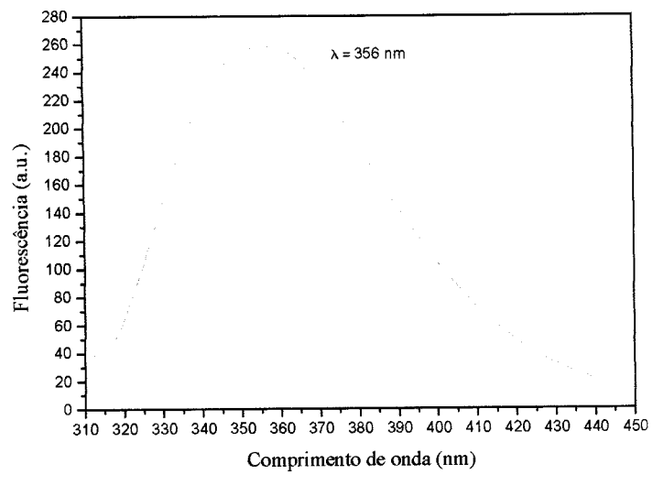


Figura 4.23: Espectro de emissão de fluorescência do FC. FC (7 μM) em tampão contendo 25 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl, pH 8,0.

A figura 4.24 mostra o espectro H-1D do FC a 20°C em pH 7,0, onde em aproximadamente 10,2 ppm aparecem os picos $H_{N\delta 3}$ dos três resíduos de triptofano. Entre 7,8 e 8,6 ppm encontram-se as ressonâncias relativas a prótons H_N de cadeia principal e entre 6,8 e 7,7 ppm podem ser vistas as ressonâncias de prótons H_N de cadeias laterais. O sinal da água,

pré-saturado, aparece em 4,8 ppm, seguido dos prótons H_α entre 4,6 e 4,0 ppm. Desta forma a baixa dispersão dos picos na região H_N da cadeia principal, assim como dos prótons H_α indicam proteínas em *random-coil* (com pouco conteúdo de estrutura secundária regular). A baixa dispersão de picos resulta em grande sobreposição espectral, tornando praticamente impossível o assinalamento de picos em possíveis experimentos multidimensionais. Aliado a este fato, existe uma grande quantidade de prolinas (17 – 14,3%) que, por não possuírem o próton H_N na cadeia principal, dificultam o assinalamento seqüencial em experimentos convencionais de tripla ressonância.

Em 3,8 ppm são vistos multipletos fortes, provenientes do glicerol utilizado para conservação das membranas de centricons utilizados na concentração da amostra. Apesar de quatro pré-lavagens com H_2O Milli-Q de 20 minutos sob centrifugação a 5000xg, os picos referente ao glicerol residual são bastante intensos. As ressonâncias dos prótons restantes de cadeias laterais se situam entre 3,4 ppm e 0,7 ppm. Abaixo de 0,7 ppm não são encontrados picos para proteína, outro indício da falta de elementos estruturados. O tripleto fraco a 0,6 ppm se refere ao DSS, com pico principal em 0 ppm. Assim sendo, a possibilidade de uma determinação estrutural do FC por NMR pode ser descartada. Os experimentos realizados, no entanto, serviram para confirmar a condição não estruturada do FC.

Todos os resultados discutidos anteriormente, sugestionam que o Fragmento Conservado é um monômero com estrutura secundária não regular. Este fato pode ser decorrente da alta porcentagem de prolinas (17 Pro – 14,3%) na estrutura primária, que impede a formação de estruturas secundárias regulares, onde esse aminoácido em questão possui uma freqüência muito pobre. A função biológica do FC ainda é desconhecida, porém muitas regiões (curtas) ricas em aminoácidos de prolinas estão envolvidas na interação entre proteínas [62]. Portanto, é possível que o domínio FC tenha algum papel de sinalização celular

ou de integração da septina Bradeiona β em complexos maiores. Mais estudos são necessários para elucidar a função e o papel biológico desta região da Bradeiona β, considerando que a região N-terminal das septinas é extremamente variável e, portanto, possua um papel na especificidade de cada septina. A Bradeiona β é particularmente intrigante neste sentido, uma vez que sua região N-terminal (FC) é uma das mais longas entre as septinas de mamíferos (veja figura 1.3).

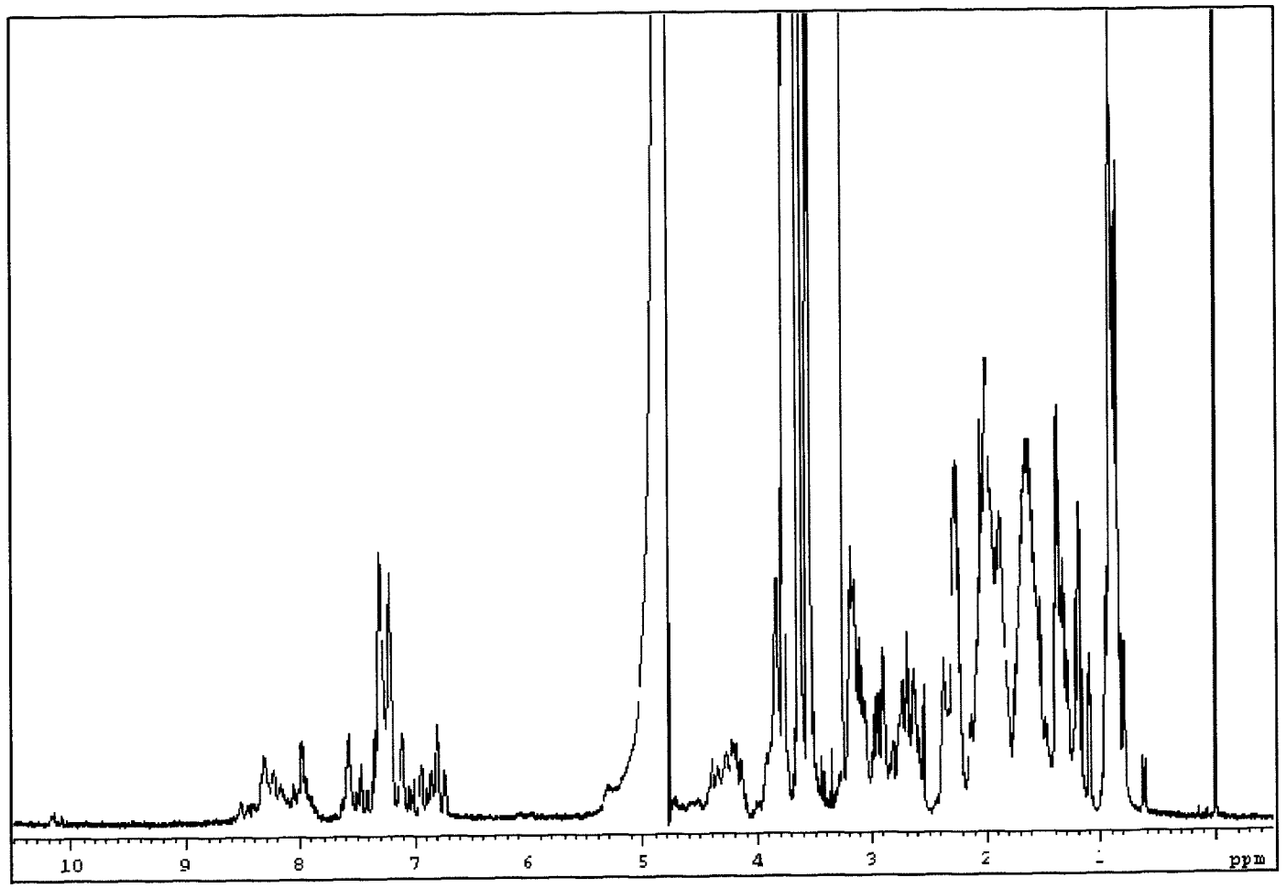


Figura 4.24: Espectro de NMR(H-1D) do FC a 20° C em pH 7,0. Espectrômetro Varian Inova, operando a 14,1 T (600 MHz).

3.2.3 Ensaios de cristalização do FC

Testes de cristalização com FC foram realizados após as etapas de purificação. O FC foi concentrado em um centricon-3, até atingir uma concentração de aproximadamente 15 mg/mL (25 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl, pH8,0). Os testes foram realizados através da técnica de difusão de vapor (*hanging drop*), utilizando os fatoriais da Hampton Research (veja seção 3.9). Testaram-se condições com diferentes concentrações de FC (15 mg/mL, 10 mg/mL e 8 mg/mL) e temperatura de 18°C e 4°C. Porém, em nenhuma das situações experimentas obtivemos cristais de FC. A dificuldade na obtenção de cristais de FC pode estar associada a estrutura secundária não regular apresentada por esse suposto domínio. A grande mobilidade apresentada pela molécula pode dificultar à formação de estruturas ordenadas e consequentemente a obtenção cristais.

4.3 Domínio GTPase (DGTPase)

Septinas são comumente descritas na literatura científica como compostas de três domínios principais [7]. Porém, os limites exatos destes domínios nunca foram estabelecidos. Na seção 4.2, discutimos a definição dos limites do domínio N-terminal (FC) da septina Bradeiona β. Nesta seção, discutiremos os procedimentos adotados na definição dos limites do DGTPase da Bradeiona β. Concomitantemente, discutiremos os resultados experimentais obtidos na expressão, purificação e análise biofísica e bioquímica do DGTPase.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

4.3.1 Primeira definição dos limites do DGTPase (DGTPase1)

Com o intuito de definir os limites do DGTPase da Bradeiona β, realizamos um alinhamento múltiplo das seqüências primárias de nove septinas de humanos utilizando o programa CLUSTAL-X [41]. Observando o alinhamento ilustrado na figura 4.25, verificamos que todas as seqüências passam a ter uma alta identidade seqüencial a partir de uma determinada região que definimos como início do DGTPase1 (N-terminal, Tyr124 em azul na seqüência da SEPT4, fig 4.25). O término do domínio (C-terminal, Arg408 em azul na seqüência da SEPT4) foi definido na região onde as seqüências primárias passaram a assumir uma baixa identidade. Assim, os limites do DGTPase1 (Tyr124-Arg408) foram definidos como ilustrado na figura 4.26, totalizando 285 aminoácidos (32.983,6 Da).

Resultados e discussões

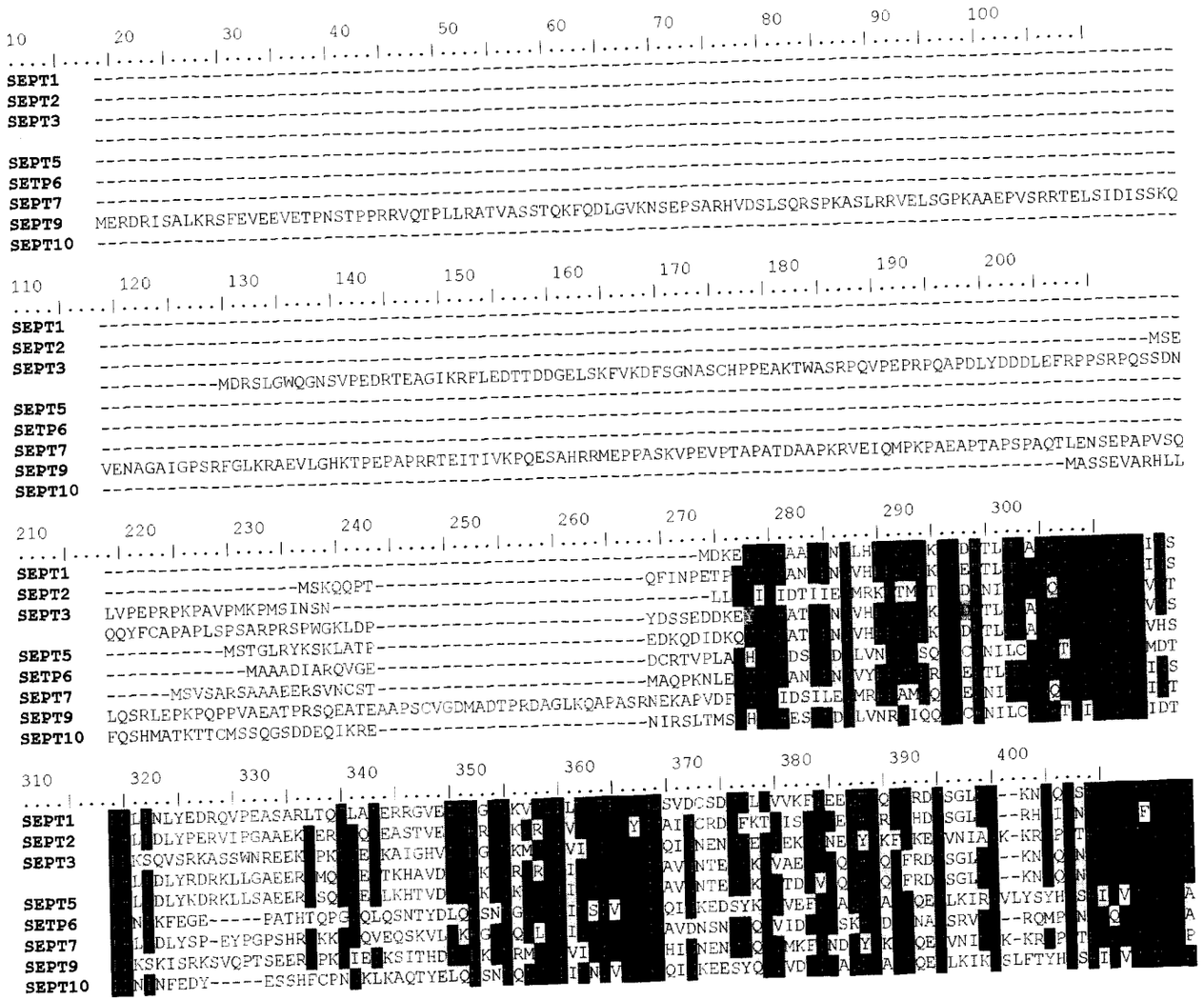


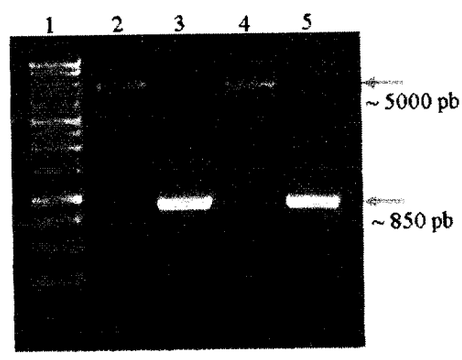
Figura 4.25: Alinhamento das seqüências de nove septinas de mamíferos. Preto, aminoácidos conservados. Cinza, aminoácidos similares. Azul e verde representam os limites da primeira e segunda definição do domínio GTPase, respectivamente.

124 RPB *P-loop* 408
YVGFATLPNQVHRRSVKKGFDFTLMVAGESGLGKSTLVN...RTHMQDLKDVTRETHYENYR

Figura 4.26: Limites escolhidos para o DGTPase1 (Tyr124-Arg408) da proteína Bradeiona β. Em azul: região polibásica (RPB) altamente conservada em septinas. Em verde: aminoácidos conservados no motivo *P-loop*.

4.3.1.1 Subclonagem e expressão do DGTPase1 (Tyr124-Arg408)

As reações de amplificação do inserto do DGTPase1, previamente definido, foram realizadas com sucesso nas condições apresentadas (veja subseção 3.1.3). A eletroforese em gel de agarose 0,8% confirmou dois produtos de PCR com aproximadamente 850 pb, como podemos averiguar na figura 4.27. Estes foram subclonados nos vetores de expressão bacteriano pGEX-5X-1 e pET28a(+). Os vetores linearizados também podem ser observados na figura 4.27. Os vetores de expressão foram replicados em *E. coli* DH5α e as confirmações das subclonagens foram realizadas por PCR de colônia (veja subseção 3.1.3). Cada clone foi seqüenciado e confirmou-se a subclonagem dos insertos dentro do correto quadro de leitura dos vetores.



(B)

Figura 4.27: Amplificação do gene referente ao DGTPase1. Gel de agarose (0,8 % TAE) do produto de PCR: 1. Padrão de massa molecular (1 kb Plus/Promega). 2. Vetor de expressão pET28a(+) linearizado. 3. Produto de PCR mostrando uma banda de aproximadamente 850 pb referente ao gene do DGTPase (*Nde*I e *BamH*I). **4**. Vetor pGEX-5X-1 linearizado. **5**. Produto de PCR mostrado uma banda de aproximadamente 850 pb referente ao gene do DGTPase (*BamH*I e *Xho*I).

Células de *E. coli* AD494(DE3), competentes por tratamento com $CaCl_2$, foram transformadas com DNA plasmidial purificado dos clones positivos de ambas as construções: **pET28-DOM1** e **pGEX-DOM1**. Testes de expressão, com o plasmídeo **pET28-DOM1**, a 20°C utilizando diferentes concentrações de IPTG produziram toda a proteína recombinante na fração insolúvel (corpos de inclusão). Na figura 4.28(A), pode-se verificar o resultado de expressão da fusão 6xHis+DGTPase1 em uma das condições experimentadas (20°C e 0,2 mM de IPTG em concentração final). A proteína recombinante foi totalmente expressa na fração insolúvel (ver coluna 2).

Com o resultado insatisfatório obtido, resolvemos fazer testes de expressão na linhagem bacteriana ORIGAMI utilizando o plasmídeo **pGEX-DOM1**, e também fazer uso de detergente para tentar solubilizar a proteína de fusão. A figura 4.28(B) mostra os resultados de testes de expressão nas linhagens AD494(DE3) e ORIGAMI, utilizando o plasmídeo **pGEX-DOM1**, na ausência e presença de 1% de tween. As condições de expressão foram as mesmas usadas anteriormente para o plasmídeo **pGEX-DOM1**. Em todos os casos experimentados, a proteína de fusão foi expressa na forma insolúvel.

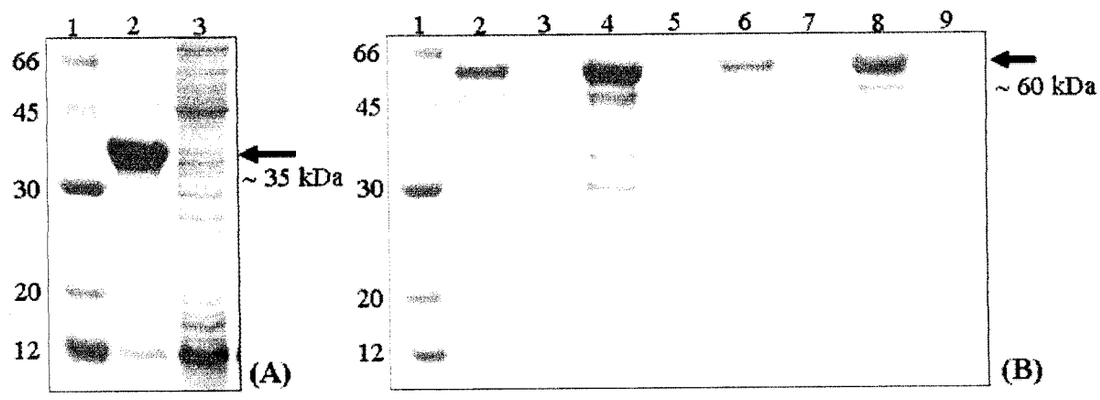


Figura 4.28: Eletroforese (SDS-PAGE 15%) ilustrando a expressão do DGTPase1 em *E. coli*. (A) Expressão da fusão 6xHis+DGTPase1 em AD494(DE3) (~35 kDa). 1. Padrão de massa molecular. 2. Fração insolúvel. 3. Fração solúvel. (B) Expressão da fusão GST+DGTPase1 em AD494(DE3) e ORIGAMI (~60 kDa). 1. Padrão de massa molecular. 2. e 3. Fração insolúvel e solúvel na ausência de Tween (ORIGAMI). 4 e 5. Fração insolúvel e solúvel na ausência de Tween (AD494); 6 e 7. Fração insolúvel e solúvel na presença de Tween (ORIGAMI). 8 e 9. Fração insolúvel e solúvel na presença de Tween (AD494).

Uma provável explicação para a insolubilidade das proteínas de fusão (6xHis+DGTPase1 e GST+DGTPase1) é a presença da região polibásica no início da definição escolhida para o DGTPase1. Como discutido anteriormente, septinas possuem este motivo polibásica (localizado antes do motivo *P-loop*) altamente conservada na seqüência primária. Como sugerido para a SEPT4(H5) [13], esta região polibásica liga-se a fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PtdIns(4,5)P_2) e também pode conferir associação a membrana. A ligação e hidrólise do GTP reduz significativamente a afinidade da proteína SEPT4(H5) por (PtdIns(4,5)P_2) [13]. Este fato sugestiona que a região polibásica pode estar internalizada na estrutura da proteína, sendo exposta somente na presença do substrato (GTP). Porém, em nossa construção a região polibásica possivelmente está exposta ao solvente devido a ausência da região N-terminal (FC). Mesmo na ausência de nucleotídeos a região polibásica estaria exposta, diferentemente da proteína integra, o que pode acarretar em interação com a membrana e consequentemente insolubilidade do produto expresso.

4.3.2 Segunda definição dos limites do DGTPase (DGTPase2)

Na segunda tentativa de definir os limites do DGTPase da proteína Bradeiona β, decidimos retirar a região polibásica comum a todas as septinas de humanos. Outra providência foi analisar com maiores detalhes a estrutura de pequenas GTPases como as proteínas RhoA e H-Ras [9,22]. O alinhamento do N-terminal (próximo do motivo *P-loop*) e C-terminal de algumas pequenas GTPases humanas está ilustrado na figura 4.29. Observando os alinhamentos e a estrutura tridimensional da proteína RhoA ilustrada na figura 4.30(A), verificamos que pequenas GTPases iniciam seu N-terminal em uma fita β hidrofóbica (FBH, internalizada na estrutura) seguida pelo motivo *P-loop* (veja em azul na figura 4.30).

```
N-terminal:                    FBH  P-loop
            RhoA: MAAIRKKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKDQ
            RhoB: MAAIRKKLVVVGDGACGKTCLLIVFSKDE
            RhoC: MAAIRKKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKDQ
            Rac1:   MQAIKCVVVGDGAVGKTCLLISYTTNA
            Rac2:   MQAIKCVVVGDGAVGKTCLLISYTTNA
            KRas:   MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNH
            NRas:   MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNH
            HRas:   MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNH
            Rhoc    GFDFTIMVAGESGLGKSTLVNSLFLTD

C-terminal:
            RhoA: RAALQARRGKKKSG-----------  LVL
            RhoB: RAALQKRYGSQNGCINC---------  KVL
            RhoC: RAGLQVRKNKRRRG------------  PIL
            Rac1: RAVLCPPPVKKRKRK-----------  LLL
            Rac2: RAVLCPQPTRQQKRA-----------  SLL
            KRas: -REIRQYRLKKISKEEKTPGCVKIKK  IIM
            NRas: -REIRQYRMKKLNSSDDGTQGCMGLP  VVM
            HRas: -REIRQHKLRKLNPPDESGPGCMSCK  VLS
            Rhoc  ----RTHMQDLKDVTRETHYENYRAQ  IQSMT
```

Figura 4.29: Alinhamento do N-terminal e C-terminal de pequenas GTPases humanas. A última seqüência é referente a proteína SEPT4 (Bradeiona β). Em verde fita β hidrofóbica internalizada em pequenas GTPases (FBH). Em azul, resíduos conservados no *loop* de ligação a fosfato (*P-loop*). Em laranja, cisteína conservada no motivo CAAX de pequenas GTPases (C é uma cisteína, A um alifático e X pode ser uma metionina, uma serina ou uma leucina).

Desse modo, definimos o início do DGTPase2 como sendo os aminoácidos hidrofóbicos que antecedem o motivo *P-loop*. O término do domínio foi definido em função da existência de um motivo conservado no C-terminal de pequenas GTPases, o motivo CAAX, possivelmente presente na seqüência primária da Bradeiona β (CIQS, aminoácidos 411-414). Neste motivo, C é uma cisteína altamente conservada, A um alifático e X poder ser uma metionina, serina ou leucina. Assim, o DGTPase2 iniciou no aminoácido Asp144 e finalizou no aminoácido Thr416, excluindo assim a região polibásica. O DGTPase2 (Asp144- Thr416, em verde na figura 4.25) definido contém 273 aminoácidos e massa molecular de 31.587,9 Da. A comparação entre os dois limites definidos para o DGTPase da Bradeiona β estão ilustrados na figura 4.30(B).

(A)

```
124          RPB        RH  P-loop                          408
YVGFATLPNQVHRKSVKKGFDFTLMVAGESGLGKSTLVN...RTHMQDLKDVTRETHYENYR
                     DFTLMVAGESGLGKSTLVN...RTHMQDLKDVTRETHYENYRAQCIQSMT
                     144                                                416
```

(B)

Figura 4.30: **(A)** Estrutura tridimensional da pequena GTPase RhoA unida com GTPγS (um análogo não hidrolisável do GTP). Em azul a fita β hidrofóbica internalizada seguida pelo motivo *P-loop*. O GTPγS unido também pode ser observado. **(B)** Dois limites definidos para o DGTPase da proteína Bradeiona β: em marrom a região polibásica, em verde a provável fita β hidrofóbica e em azul o motivo *P-loop*. A primeira e a segunda seqüência são referentes ao DGTPase1 (Tyr124-Arg408) e ao DGTPase2 (Asp144-Thr416), respectivamente.

4.3.2.1 Subclonagem, expressão e purificação do DGTPase2

Novamente, a região referente à nova definição do domínio GTPase (DGTPase2, Asp144- Thr416) foi amplificada e subclonada nos vetores de expressão bacteriano pGEX-5X-1 e pET28a(+). A figura 4.31 mostra os resultados dos produtos de PCR com bandas de aproximadamente 850 pb referentes ao gene do DGTPase2. Os transformantes

selecionados, de cada construção, foram confirmados através da técnica de PCR de colônia (veja subseção 3.1.3). Cada clone foi seqüenciado e confirmou-se a subclonagem dos insertos dentro do correto quadro de leitura dos vetores.

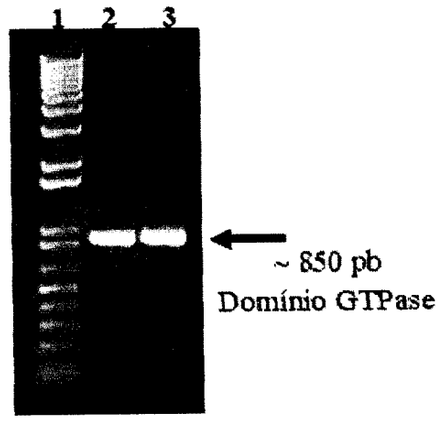


Figura 4.31: Amplificação da região que codifica o DGTPase2 . **1.** Padrão de massa molecular. **2.** Região que codifica o DGTPase2 para subclonagem no vetor pGEX-5X-1. **3.** Região que codifica o DGTPase2 para subclonagem no vetor pET28a(+).

Células de *E. coli*, competentes por tratamento com $CaCl_2$, foram transformadas com DNA plasmidial purificado dos clones positivos de cada construção: **pGEX-DOM2** e **pET28-DOM2**. Testes de expressão na linhagem AD202, utilizando o plasmídeo **pGEX-DOM2**, a 20°C produziram proteína de fusão solúvel e estável. Na figura 4.32, pode-se observar as etapas da purificação da proteína de fusão. A proteína de fusão após eluição da matriz de afinidade, com tampão A acrescido de 10 mM de GSH, e diálise (em membrana com corte de 12-14 kDa, veja subseção 3.2.3) para retirada da GSH e contaminantes de baixa massa molecular, está exibida na coluna 6. O rendimento da purificação foi de aproximadamente 7 mg de proteína de fusão solúvel (GST+DGTPase2) por litro de cultura. Este valor foi estimado segundo descrito na subseção 3.3.

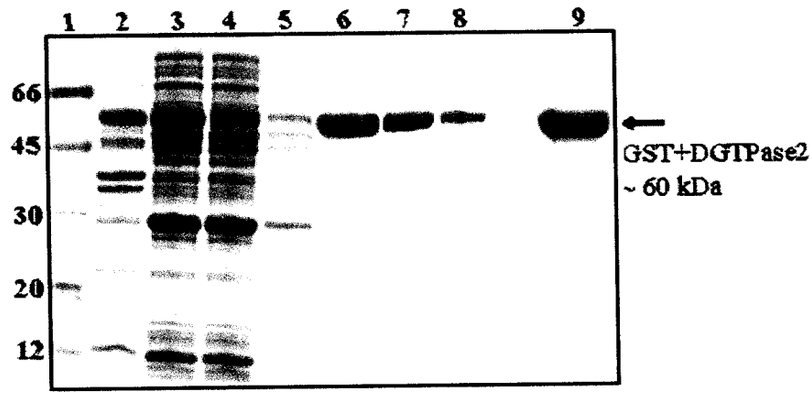


Figura 4.32: Purificação da proteína de fusão GST+DGTPase2. Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 15%). **1**. Padrão de massa molecular (kDa). **2**. Fração insolúvel após lise bacteriana. **3**. Fração solúvel após lise bacteriana (entrada da resina de afinidade). **4**. Saída da resina de afinidade. **5**. Lavagem da resina de afinidade com tampão A. **6 – 8**. Proteína de fusão (GST+DGTPase2) após eluição da matriz com tampão A acrescido de GSH (10 mM). **9**. Proteína de fusão após diálise (em tampão A) para retirada da GSH e contaminantes de baixo peso molecular.

Realizamos também testes de expressão utilizando o plasmídeo **pET-DOM2** na linhagem bacteriana ER2566. Para avaliar a solubilidade do produto expresso, variamos a concentração de indutor (IPTG) e a temperatura de incubação da cultura. Os resultados finais dos ensaios de expressão estão resumidos na figura 4.33.

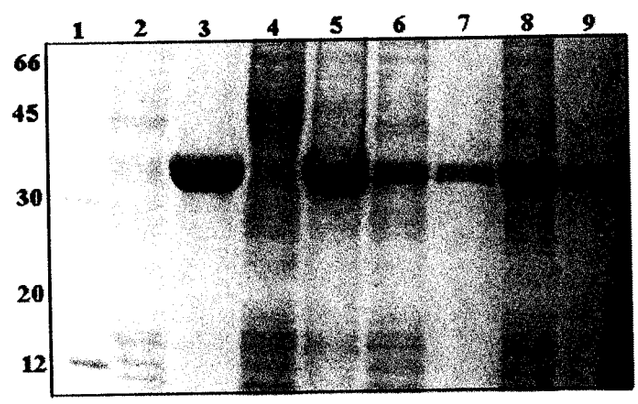


Figura 4.33: Testes de expressão da proteína de fusão 6xHis+DGTPase2 na linhagem ER2566. 1. Marcador de massa molecular. 2. Fração solúvel com 10 μM IPTG e incubação por 4 h a 37°C. 3. Fração insolúvel com 10 μM IPTG e incubação por 4 h a 37°C. 4. Fração solúvel com 0,1 mM IPTG e incubação por 4 h a 37°C. 5. Fração insolúvel com 0,1 mM IPTG e incubação por 4 h a 37°C. 6. Fração solúvel com 0,3 mM IPTG e incubação por 4 h a 30°C. 7. Fração insolúvel com 0,3 mM IPTG e incubação por 4 h a 30°C. 8. Fração solúvel com 0,5 mM IPTG e incubação por 10 h a 20°C. 9. Fração insolúvel com 0,5 mM IPTG e incubação por 10 h a 20°C.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

A expressão à temperatura de 37°C, com 10 μM ou 0,1 mM de IPTG e incubação por 4 h levou o produto para a fração insolúvel (veja fig. 4.33, linhas 3 e 5). A expressão à temperatura de 30°C, com 0,3 mM de IPTG e incubação por 4 h levou parte da proteína a fração solúvel e parte a insolúvel (veja fig. 4.33, linhas 6 e 7). A expressão à temperatura de 20°C, com 0,5 mM de IPTG e incubação por 16 h levou a maior parte da proteína a fração solúvel (veja fig. 4.33, linhas 8 e 9). Assim, verificamos que a ultima condição analisada apresentou os melhores resultados de expressão solúvel do produto heterólogo 6xHis+DGTPase2. Em seguida, realizamos uma expressão em maior escala para subseqüente purificação.

Todas as etapas da purificação da proteína de fusão 6xHis+DGTPase2, utilizando cromatografia de afinidade (Ni-NTA), estão exibidas na figura 4.34. A proteína de fusão eluída com tampão A acrescido de imidazol (100 mM) esta exibida nas colunas 5-6. Na coluna 8, pode-se visualizar a proteína de fusão pura, após as etapas de purificação.

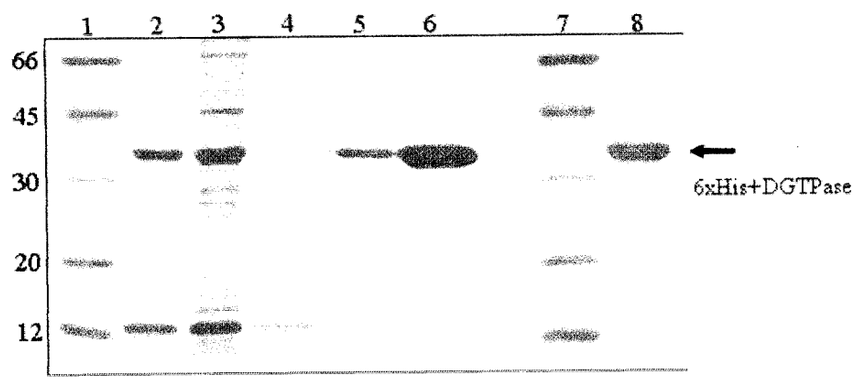


Figura 4.34: Expressão e purificação da proteína de fusão 6xHis+DGTPase2. **1**. e 7. Padrão de massa molecular. **2**. Fração insolúvel. **3**. Fração solúvel. **4**. Lavagem da resina de afinidade com tampão A acrescido de 10 mM de imidazol. **5-6**. Eluições da proteína de fusão com tampão A acrescido de imidazol (100 mM). **8**. Proteína de fusão após diálise para retirada do imidazol e contaminantes de baixa massa molecular.

Neste caso, o rendimento da purificação foi de aproximadamente 8 mg de proteína de fusão (6xHis+DGPTase2) solúvel por litro de cultura. Praticamente o dobro do rendimento obtido com a primeira construção, considerando-se a presença da GST

(~27Kda) na proteína de fusão GST+DGTPase2. Contudo, a proteína de fusão GST+DGTPase mostrou-se bastante estável ao contrário da 6xHis+GTPase que precipitou em concentrações maiores que 1 mg/mL na ausência de imidazol. A baixas concentrações (< 1 mg/mL) a fusão 6xHis+DGTPase mostrou-se estável na ausência de imidazol (após diálise). Este comportamento de instabilidade da fusão 6xHis+DGTPase2 a altas concentrações pode ser decorrente da presença da cauda com histidinas, que causa a agregação e posterior precipitação do produto heterólogo.

4.3.2.2 Análises estruturais da proteína de fusão 6xHis+DGTPase2

A vantagem da expressão fusionada a um peptídeo (cauda com histidinas, por exemplo) é a possibilidade da análise estrutural do produto heterólogo, o que não pode ser realizado na expressão fusionada com proteínas carreadoras (GST, por exemplo). O resultado obtido na análise da proteína de fusão 6xHis+DGTPase2 através de DLS está ilustrado na figura 4.35. A proteína de fusão (~0,5 mg/mL) estava em tampão 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0. O maior pico observado está centrado em um raio hidrodinâmico de 5,9 nm. Assumindo uma partícula esférica, este valor corresponde a massa molecular de 214 kDa que é consistente com a massa de um hexâmero. Interessantemente, resultados de DLS também indicam que a septina Bradeiona β é produzida em *E. coli* na forma de um hexâmero (subseção 4.1.2). O resultado de DLS também mostrou que nas condições analisadas a solução protéica apresentava-se monodispersiva.

Estes resultados são indícios que a oligomerização pode ocorrer também através do domínio central GTPase e não somente através do domínio C-terminal (*coiled-coil*). No caso da septina Cdc11 (presente em leveduras) foi verificado que o domínio GTPase é importante na associação da Cdc11 com ela mesmo, indicando que este domínio pode

mediar está interação [63]. Este fato é consistente com os resultados apresentados aqui. O menor pico observado, similarmente a análise da Bradeiona β, corresponde a aproximadamente 10% da massa total e está centrado em um raio hidrodinâmico de aproximadamente 35 nm. Isto provavelmente é um indicativo de formação de filamentos ou agregados, similar ao observado com a Bradeiona β inteira e outras septinas [5,16]. Contudo, como já discutido na introdução desta tese, o ambiente bacteriano pode não ser favorável para formação ou manutenção dos filamentos de septinas.

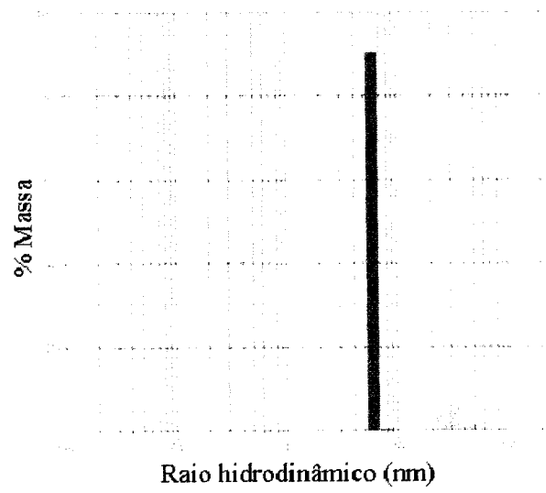


Figura 4.35: Análise da proteína de fusão 6xHis+DGTPase2 através de DLS. A proteína de fusão (~0,5 mg/mL) estava em 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0.

A figura 4.36 exibe o espectro de CD obtido para a proteína de fusão 6xHis+DGTPase2, caracterizado por mínimos próximos a 220 nm e 209 nm e um máximo próximo a λ = 197 nm. O programa de predição de estrutura secundária PSIPRED [42] prediz que o domínio GTPase possui 40% de hélices α, 19% de folhas β e 41% de estruturas irregulares (veja tabela 4.1).

SC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

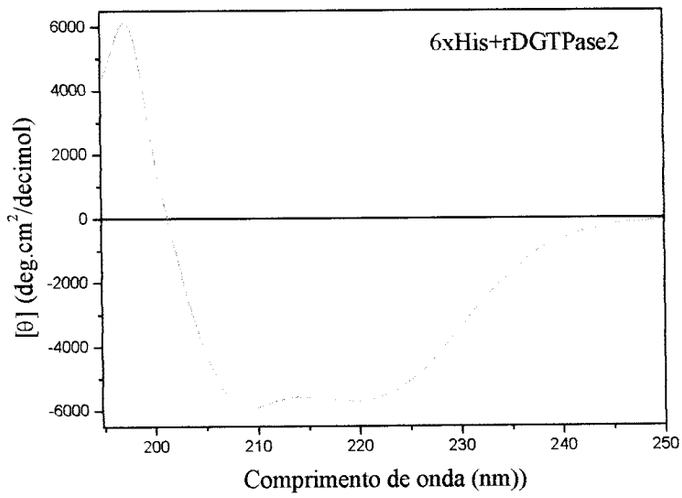


Figura 4.36: Espectro de CD da proteína de fusão 6xHis+DGTPase2. A proteína de fusão estava em 25 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl, pH8,0.

Os resultados obtidos da desconvolução do espectro de CD e através de predição de estrutura secundária estão de acordos. A fusão 6xHis+DGTPase2 é formada por uma mistura de estruturas α/β, similar ao observado em muitas pequenas GTPases. Os espectros de CD da Bradeiona β, FC e 6xHis+DGTPase estão exibidos conjuntamente na figura 4.37.

O espectro da Bradeiona β possui um perfil parecido com o espectro da proteína de fusão 6xHis+DGTPase2 indicando, em ambos os casos, a presença de elementos na forma de hélices α na estrutura secundária. Porém, a intensidade do espectro de CD da Bradeiona β é maior provavelmente devido à presença do domínio *coiled-coil* C-terminal. Em contraste, o espectro do FC apresentou um perfil totalmente diferente dos espectros anteriores, coma uma intensidade muito baixa devido à ausência de estruturas secundárias regulares (hélices e folhas β). Através destes resultados concluímos que a septina Bradeiona β é composta por três distintas regiões: i) o Fragmento Conservado (N-terminal) com estrutura secundária irregular; ii) o domínio central GTPase com uma mistura de estruturas α/β (similar a estrutura de pequenas GTPases) e iii) o domínio *coiled-coil* (C-

terminal) com predominância de estrutura α. Esta conclusão não é completamente inesperada dado as informações conhecidas sobre pequenas GTPases. Porém, não é uma informação trivial devido a baixa identidade seqüencial dos domínios GTPases de septinas com pequenas GTPases e a completa ausência de estruturas tridimensionais de septinas (e seus domínios isolados) na literatura científica.

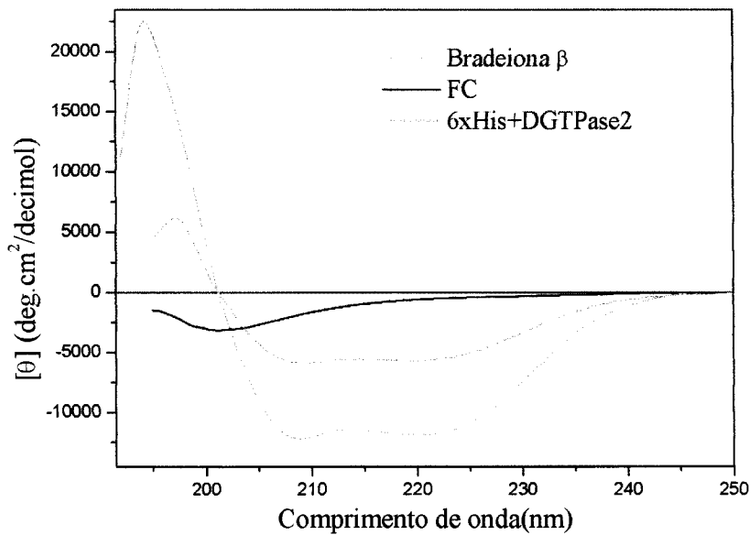


Figura 4.37: Espectros de CD da proteína Bradeiona β (4 μM), FC (10 μM) e 6xHis+DGTPase (9 μM) . Em todos os casos a proteína analisada estava em 25 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl, pH 8,0.

4.3.2.3 Atividade GTPase da proteína de fusão GST+DGTPase2

A atividade da proteína de fusão GST+DGTPase2, similarmente a proteína Bradeiona β, foi verificada por eletroforese capilar. A proteína de fusão GST+DGTPase2 foi escolhida para os ensaios enzimáticos devido a sua ótima estabilidade e o bom rendimento em sua purificação. O gráfico de Michaelis-Menten obtido para a proteína de

fusão GST+DGTPase2 pode ser visualizado na figura 4.37. Similarmente ao caso da Bradeiona β, o valor de K_m apresentado nesta seção somente será válido se a proteína de fusão GST+DGTPase2 possuir um comportamento que possa ser modelado pela cinética de Michaelis-Menten, em outras palavras, que a constante k_{-2} seja desprezível. Contudo, estudos adicionais são necessários para a determinação da constante k_{-2} para a proteína Bradeiona β e a fusão GST+DGTPase2.

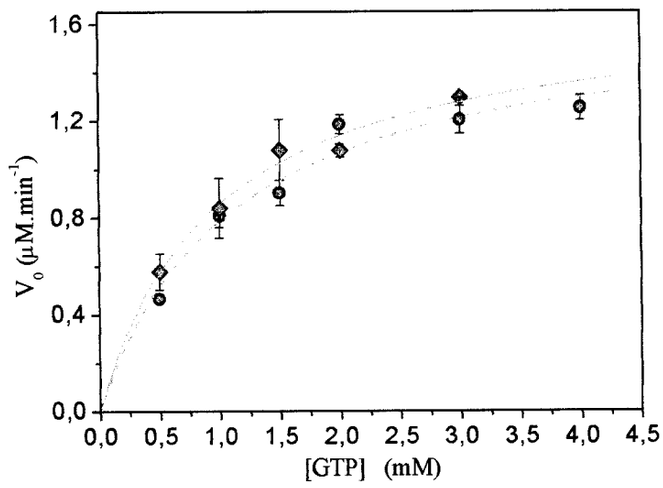


Figura 4.37: Gráfico de Michaelis-Menten para a proteína de fusão GST+DGTPase2. Velocidade inicial da reação em função da concentração de substrato. Os parâmetros K_m e k_{cat} foram obtidos pelo ajuste de uma hipérbole retangular nos dados experimentais (programa Origin 7.0). Os dois experimentos foram realizados em dias diferentes utilizando proteínas purificadas em períodos distintos. As reações foram realizadas em tampão 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8,0, acrescido de 1 mM $MgCl_2$.

Os parâmetros cinéticos obtidos no ajuste dos pontos experimentais, utilizando a relação 2 (veja subseção 3.8.2), foram: V_{max} = 1,7 ± 0,1 μM.min^{-1}, K_m = 1,0 ± 0,3 mM e k_{cat} = 9 x 10^{-3} s^{-1}. Em princípio, esperávamos que estes parâmetros fossem compatíveis com os valores obtidos para a proteína Bradeiona β: K_m = 2,0 mM e kcat = 0,25 s^{-1}, contudo significantes diferenças foram observadas. Um dos principias motivos desta discrepância observada é a possibilidade da GST presente na proteína de fusão afetar a

atividade GTPase. Adicionais estudos estruturais e bioquímicos são necessários para elucidar estas observações.

Similarmente a Bradeiona β, a atividade da proteína de fusão GST+DGTPase2 mostrou-se dependente da presença de íons divalentes (Mg^{2+}). O comportamento da atividade GTPase da fusão GST+DGTPase2 em função da concentração de íons Mg^{2+} é mostrado na figura 4.38. O papel do íon Mg^{2+} na reação pode não somente se limitar a ativação, mas também ter uma função regulatória. Na presença de uma quantidade excessiva de íons, a enzima diminui acentuadamente sua atividade. A figura 4.38 mostra v_0 diminuindo a partir de concentrações maiores que 2,5 mM (a reação contém 3 mM de GTP). As velocidades das reações na presença de 1 mM e 10 mM de Mg^{2+} são 1,4 $\mu M.min^{-1}$ e 0,4 $\mu M.min^{-1}$, respectivamente. O efeito de inibição verificado pode ser atribuído, similarmente a Bradeiona β, a dois fenômenos: i) a afinidade de íons Mg^{2+} pelo sítio ativo da molécula ou ii) a baixa dissociação do GDP.

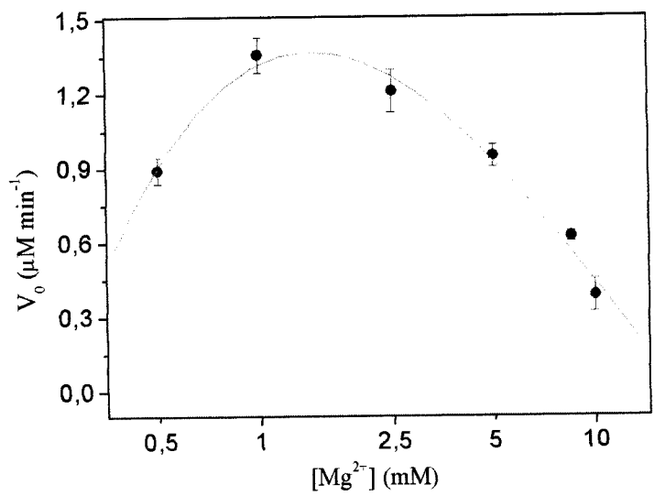


Figura 4.38: Comportamento da atividade GTPase da proteína de fusão GST+DGTPase2 em função da concentração de íons Mg^{2+}. Velocidade inicial (v_0) da reação em função da concentração de íons Mg^{2+}. A reação contém 3 mM GTP e 3,1 μM de proteína de fusão. O eixo x esta em escala logarítmica.

A grande maioria das enzimas, cuja atividade catalítica depende de íon inorgânico, requer a presença de cátions (Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{2+}), havendo poucos casos em que ânions são cofatores. No caso de pequenas GTPases o íon Mg^{2+} é o principal cofator mas, em vários situações podendo ser substituído por íons equivalentes como o Mn^{2+} [65]. Resultados comparativos da influência de Mg^{2+} e Mn^{2+} (concentrações iguais) na catálise de GTP pela fusão GST+DGTPase2 podem ser observados na figura 4.39. A fusão GST+DGTPase2 hidrolisou GTP na presença de íons Mn^{2+}. Porém, a eficiência catalítica na presença do íon Mg^{2+} foi maior do que na presença de Mn^{2+} (nas mesmas condições de reação enzimática). Após incubação *overnigth* a porcentagem de GDP formado na presença de íons Mg^{2+} e Mn^{+2} foram de 47% e 25%, respectivamente. Apesar da menor eficiência, verificamos que a o íon Mn^{2+} pode substituir o íon Mg^{2+} na reação de catálise do GTP pela septina Bradeiona β.

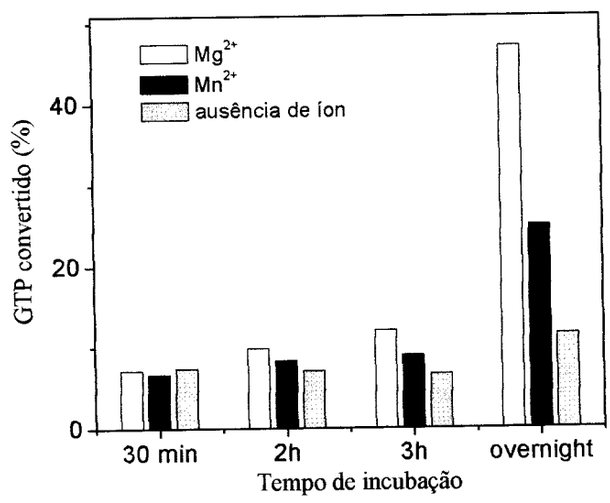
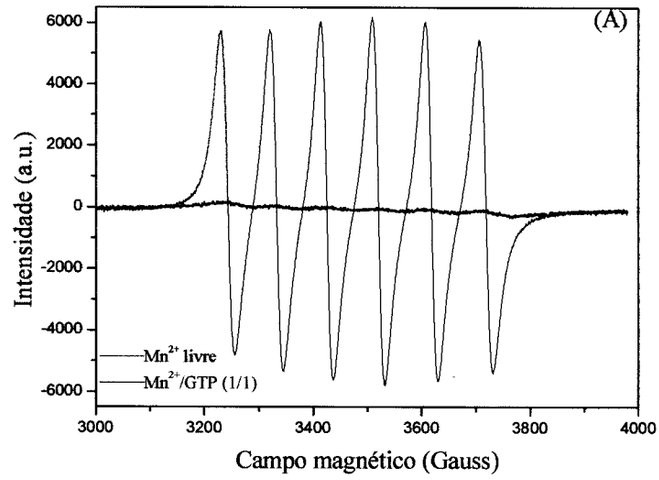


Figura 4.39: Porcentagem de GTP convertido pela fusão GST+DGTPase2 durante diferentes tempos de incubação com 0,5 mM de $MgCl_2$ ou $MnCl_2$ em comparação com o controle (ausência de íons). Cada reação era composta de 3 mM GTP e 3,1 μM de proteína de fusão.

A observação que íons Mn^{2+} pode também ativar a enzima abriu a possibilidade do uso de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) para monitorar a ligação deste íon no

substrato e na proteína [65]. Mn^{2+} é frequentemente empregado nos estudos de EPR como modelo para outros íons divalentes. O espectro de EPR do Mn^{2+} livre, exibido na figura 4.40(A), é caracterizando por seis linhas bem definidas devido ao seu spin nuclear I = 5/2 (2I+1). A adição de uma concentração equimolar de GTP extinguiu completamente o sinal observado do Mn^{2+} livre em solução (veja figura 4.40(A)), indicando que a maioria dos íons estão ligados ao GTP. A adição na proporção 4:1 (320μM Mn^{2+}:80μM GTP) diminui sensivelmente o sinal do Mn^{2+} livre, indicando que parte dos íons estão ligados ao GTP. Por outro lado, a adição na proporção 4:1 (320μM Mn^{2+}:80μM proteína de fusão GST+DGTPase2) diminui o sinal do Mn^{2+} livre, porém com uma magnitude menor (veja figura 4.40(B)). Estes experimentos indicam qualitativamente que o íon Mn^{2+} liga-se preferencialmente ao GTP em comparação com a proteína.

Os resultados obtidos corroboram com um simples modelo que pode explicar o papel do Mg^{2+} na ativação/inibição da atividade GTPase, supondo um comportamento do Mn^{2+} similar ao Mg^{2+}. A atividade ótima é esperada ser observada quando toda molécula de GTP está ligada a um Mg^{2+} (ou Mn^{2+}). Para valores altos de [GTP]/[Mg^{2+}], a concentração de Mg^{2+} é baixa em relação ao GTP e uma diminuição na atividade é observada. Por outro lado em condições de excesso de íons, o Mg^{2+} livre pode ligar-se ao sítio ativo da enzima impedindo a entrada do complexo GTP+Mg^{2+} devido a efeitos estereoquímicos ou eletrostáticos. Se a afinidade do Mg^{2+} por GTP é significativamente maior que a afinidade pela proteína, podemos supor que o íon liga-se a proteína somente quando todo o GTP está ligado. Todavia, a inibição da taxa de dissociação do GDP em altas concentrações de íons Mg^{2+} reportadas para outras pequenas GTPases (Ras-*like*, Rab5) [21] também é um modelo aplicável ao fenômeno de inibição observado nos estudos da septina Bradeiona β e da proteína de fusão GST+DGTPase.



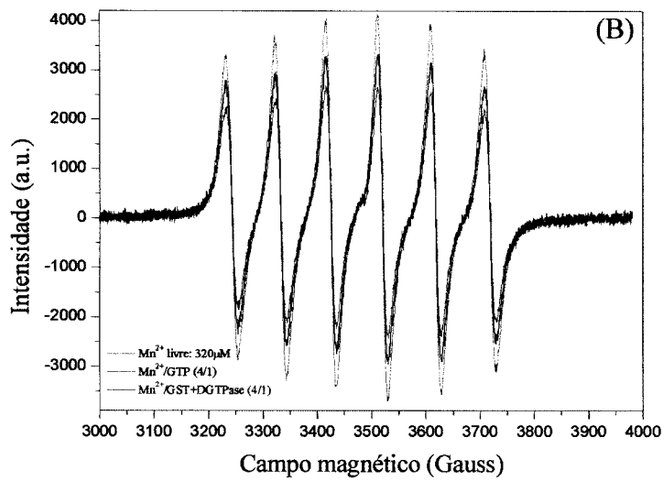


Figura 4.40: Análise da interação do íon Mn^{2+} com a proteína de fusão GST+DGTPase2 através de EPR. (A) Azul, Mn^{2+} livre em solução. Preto, solução equimolar de Mn^{2+} e GTP (1:1). (B) Vermelho, Mn^{2+} livre em solução. Azul, Mn^{2+} na presença de GTP na proporção 4:1 (320 μM:80 μM). Preto, Mn^{2+} na presença de GST+DGTPase2 na proporção 4:1 (320 μM:80 μM).

4.3.2.4 Estudo da especificidade da proteína de fusão GST+DGTPase2

Proteínas GTPases são geralmente caracterizadas por uma alta especificidade pelos seus substratos (nucleotídeos específicos) [64]. A magnitude da discriminação entre os nucleotídeos de guanina e outros nucleotídeos, é tipicamente de 10^2 a 10^3 vezes mais específica para GTPases bem estudadas [64]. Assim, aplicamos eletroforese capilar para estudar a especificidade da proteína de fusão GST+DGTPase2 por dois distintos nucleotídeos: GTP e ATP (bases púricas). Realizamos os ensaios com as mesmas concentrações de substratos (GTP ou ATP), íons Mg^{2+} e GST+DGTPase2 (10 μM). Os gráficos de Michaelis-Menten obtidos para GTP e ATP, com a proteína de fusão GST+DGTPase2, estão exibidos na figura 4.41.

A proteína de fusão GST+DGTPase2 mostrou pequena discriminação entre dois diferentes nucleotídeos utilizados. A eficiência catalítica da GST+DGTPase por GTP mostrou-se ser praticamente igual a eficiência por ATP. A especificidade de GTPases por nucleotídeos, tipicamente surge de um conjunto de interações com a base guanina, sendo a ligação de hidrogênio entre o aminoácido Asp conservado (motivo G4, **XKXD)** e a amina exocíclica da guanina a interação mais preservada (veja figura 4.42). Em muitas GTPases, a mutação do resíduo Asp por Asn resulta em uma mudança na preferência do nucleotídeo de GTP por XTP (Xanthosine 5'-triphosphate) em valores superiores a 10^5 vezes [64]. A baixa diferenciação entre GTP e ATP, no caso da proteína de fusão GST+DGTPase2, sugestiona um sítio aberto, ou seja, capaz de acomodar diferentes substratos (nucleotídeos).

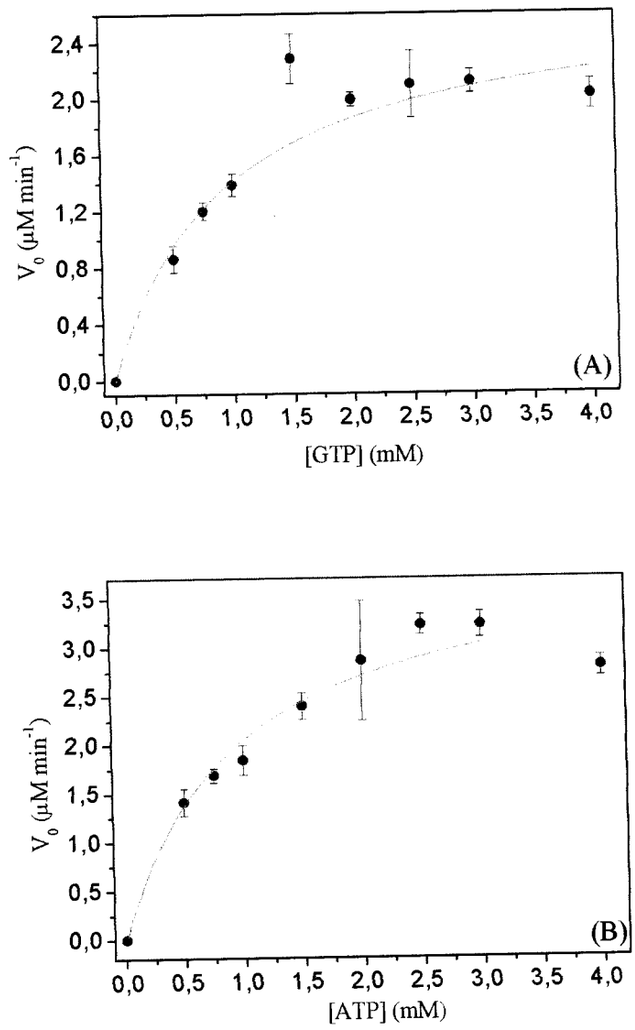


Figura 4.41: Gráficos de Michaelis-Menten obtidos para a proteína de fusão GST+DGTPase2 com dois distintos nucleotídeos. (A) Gráfico Michaelis-Menten obtido utilizando-se GST+DGTPase2 e GTP. (B) Gráfico Michaelis-Menten obtido utilizando-se GST+DGTPase2 e ATP. Em ambos os casos a concentração de íons Mg^{2+} foi de 1 mM.

A proteína GTPase FtsY [64], por exemplo, possui baixa especificidade por nucleotídeos, não discriminando fortemente mesmo entre nucleotídeos contendo purinas e pirimidinas. Porém, a estrutura cristalográfica da proteína FtsY unida com GDP ou GppNHp (análogo não hidrolisável do GTP) revelou uma grande distância na ligação entre o resíduo Asp449 e o anel de guanina (D = 4,6 Å e 3,4 Å, respectivamente). Isto é o indicativo da ausência de uma forte ligação de hidrogênio entre o oxigênio carboxílico do

resíduo Asp449 e o nitrogênio da guanina [64]. Em contraste, a correspondente distância é de 2,9 Å na estrutura da Ras (veja figura 4.42), 3,0 Å na estrutura da EF-Tu e RhoA [22,64]. Estas últimas GTPases são muito específicas para GTP, indicando que a proximidade desta interação parece estar intimamente relacionada com a seletividade da proteína.

A justa ligação do anel de guanina em clássicas GTPases (como RhoA e Ras) também leva a baixa dissociação do GDP, a qual torna-se um passo limitante nos ciclos funcionais destas GTPases e portanto, necessitando de fatores de troca de nucleotídeos para converter das suas formas com GDP e GTP ligados. Assim, um possível bolsão frouxo de ligação a nucleotídeo da Bradeiona β pode justificar a ausência de correspondentes fatores de troca de nucleotídeos para septinas.

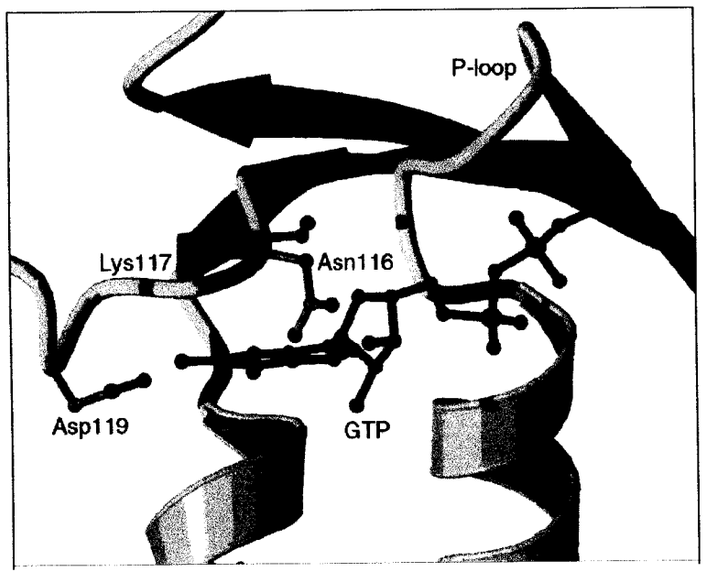


Figura 4.42: Estrutura do sítio de ligação a GTP da pequena GTPase Ras. Em roxo, GTP unido ao sítio ativo. Em laranja, o resíduo Asp119 conservado em pequenas GTPases e responsável por reconhecer o anel de guanina.

4.1 Bradeiona α

4.1.1 Subclonagem e expressão da Bradeiona α

O cDNA da proteína Bradeiona α foi amplificado através da técnica de PCR e subsequentemente, subclonado no vetor bacteriano pGEX-5X-1. Utilizamos como molde inicial o plasmídeo contendo o cDNA da Bradeiona α, cedido pela Dra. Tanaka. Um total de nove transformantes positivos foram verificados através de análise de restrição (com as endonucleases *Bam*HI e *Xho*I, veja figura 4.43).

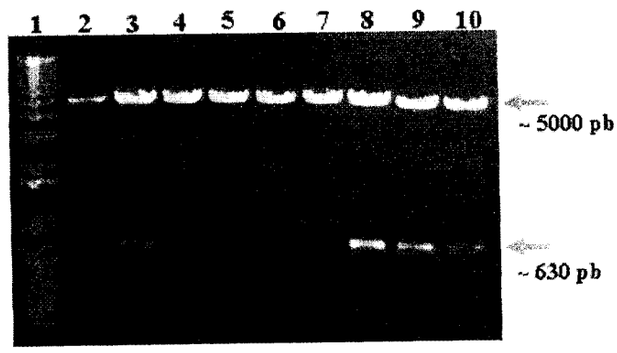


Figura 4.43: Análise de restrição dos transformantes. 1. Padrão de massa molecular, 2 a 10. Vetor bacteriano pGEX-5X-1 e cDNA da Bradeiona α após digestão (sítios de *Bam*HI e *Xho*I). Os vetores indicados nas colunas 4-7 não mostraram a presença do cDNA da Bradeiona α.

O sequenciamento confirmou a subclonagem do cDNA, dentro do correto quadro de leitura do vetor. Ensaios de expressão do cDNA da proteína Bradeiona α, na linhagem bacteriana AD202, foram realizados empregando o plasmídeo selecionado **pGEX-Bradα**. Testes variando-se a temperatura de incubação da cultura (37°C e 20°C) e a concentração de IPTG (0,01 mM – 1,0 mM) não propiciaram resultados satisfatórios. Em nenhuma das situações experimentadas a proteína recombinante foi detectada (solúvel ou insolúvel). A existência de codóns raros para *E. coli* na seqüência da Bradeiona α pode impedir que a linhagem bacteriana utilizada na expressão reconheça o cDNA subclonado [54].

Examinando a seqüência primária da proteína Bradeiona α [11], constatamos um grande teor de aminoácidos hidrofóbicos próximos ao C-terminal da molécula. A existência da seqüência hidrofóbica **$(CV)_6$CLCVCV** e a alta porcentagem de aminoácidos de prolinas presentes na seqüência de aminoácidos (27 prolinas - 13%) supostamente conferem a essa molécula características singulares. A função biológica da proteína Bradeiona α ainda é desconhecida, porém é conhecida sua importante relação com alguns estados cancerosos [26,27].

Conclusões e perspectivas

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

Conclusões e perspectivas

Neste presente trabalho, procuramos realizar uma análise estrutural e bioquímica da proteína Bradeiona β e de seus domínios. O estudo de septinas é relevante porque este grupo de proteínas está envolvido em vários processos biológicos essenciais, como exocitose e citocinese. Este trabalho fornece informações relevantes que podem auxiliar no estudo futuro dos mecanismos de ação de septinas e na compreensão do papel das proteínas Bradeiona α e β na citocinese de células de câncer.

Os primeiros testes de expressão do gene da proteína Bradeiona β foram realizados utilizando-se o vetor cedido pela Dra. Tanaka, porém os resultados não foram satisfatórios. A proteína foi expressa na forma insolúvel (corpos de inclusão) em todas as condições analisadas. Com a inviabilidade de se utilizar o vetor cedido, optamos em utilizar um novo sistema de expressão. A nova construção possuía ligada a Bradeiona β uma proteína carreadora (GST) que esperávamos aumentar a solubilidade da proteína de fusão. Utilizando a nova construção obtivemos proteína solúvel, a qual foi purificada por cromatografia de afinidade e exclusão molecular. Resultados de DLS e cromatografia de exclusão molecular sugestionam que a proteína Bradeiona β foi expressa como um estável oligômero, formado de no mínimo de dois monômeros. A análise realizada através de espectroscopia de CD indica a presença de uma alta porcentagem de hélices α na estrutura primária, como evidenciado pela forte elipticidade ao redor de 208 nm e 220 nm.

Embora o produto expresso, Bradeiona β, fosse estável e apresentasse estrutura secundária ordenada, tínhamos que verificar se a proteína estava biologicamente ativa. Assim, a atividade GTPase da proteína Bradeiona β foi evidenciada através de um método alternativo. Este método é baseado no uso de eletroforese capilar para separar e quantificar

o substrato e o produto da hidrólise de uma reação enzimática. Ótimas separações foram obtidas utilizando o tampão de corrida composto de 10 mM MES, pH 6,5. GTP e GDP foram identificados através dos tempos de migrações, em comparação com padrões previamente definidos e pelos espectros de absorção. GDP foi evidentemente produzido como resultado da hidrólise do GTP pela proteína Bradeiona β, sugestionando que a catálise e liberação do produto ocorrem na ausência de adicionais proteínas auxiliares. Isto é consistente com o fato que fatores de troca de nucleotídeos de guanina nunca terem sido descritos na literatura no caso de septinas. Na ausência de Bradeiona β, a taxa de hidrólise espontânea do GTP mostrou-se ser efetivamente desprezível.

Um fator que afeta a hidrólise de GTP pela Bradeiona β é a concentração de íons Mg^{2+} e esta característica é verificada para a atividade GTPase de todas as septinas analisadas. A presença de Mg^{2+} foi essencial para a hidrólise de GTP, porém em concentrações altas de íons uma queda acentuada na hidrólise foi verificada, indicando que a enzima foi inibida. A inibição observada a altas concentrações pode ser devida provavelmente a dois fenômenos: i) à afinidade intrínseca da enzima pelo metal, ocasionando um impedimento estérico ou repulsão eletrostática do substrato ou alternativamente ii) devido à baixa dissociação do GDP [21]. Cristais de Bradeiona β na forma de placas foram obtidos, a 4°C, através da técnica de difusão de vapor. Os melhores cristais difrataram a uma máxima resolução de 6,0 Å em uma fonte de raios X com anodo rotatório. Com está resolução não foi possível obter resultados estruturais relevantes da proteína recombinante. Porém, estes cristais inéditos abrem perspectivas para uma futura determinação da estrutura tridimensional da proteína Bradeiona β, ou seja, a estrutura da primeira proteína da família septina.

O Fragmento Conservado foi produzido (utilizando-se dois distintos vetores) e subseqüentemente purificado através de cromatografia de afinidade e exclusão molecular. Cromatografia de exclusão molecular e DLS indicam que o FC recombinante foi expresso

como um estável monômero. Resultados de espectroscopia de CD, fluorescência e NMR sugestionam que o FC possui uma estrutura secundária irregular. Este fato pode ser decorrente da alta porcentagem de prolinas (17 Pro – 14,3%) na estrutura primária, que dificulta a formação de estruturas secundária regulares. A função biológica do FC ainda é desconhecida, porém muitas regiões (curtas) ricas em aminoácidos de prolinas estão envolvidas na interação entre proteínas.

Duas distintas definições do domínio GTPase foram efetuadas. A definição que incluía na seqüência primária a região polibásica foi expressa na forma insolúvel em todas as condições analisadas. Porém, a definição que não compreendia está região foi expressa solúvel em dois distintos sistemas de expressão bacterianos utilizados. A análise do DGTPase através de DLS, forneceu um raio hidrodinâmico compatível com a massa de um hexâmero. Este resultado sugestiona que a interação entre dois monômeros de Bradeiona β também devem ocorrer através do DGTPase. Similarmente a proteína Bradeiona β, o espectro de CD da proteína de fusão 6xHis+DGTPase2 sugestionou a presença de hélices α na estrutura secundária (porém em uma menor magnitude). Está redução na magnitude do conteúdo de hélices α no espectro do 6xHis+DGTPase2, pode ser decorrente da ausência do suposto domínio *coiled-coil* C-terminal.

A atividade da proteína de fusão GST+DGTPase foi confirmada através da técnica de CE. Novamente, a presença de Mg^{2+} foi essencial para a hidrólise de GTP. Concentrações altas de íons também provocaram uma queda acentuada na hidrólise do substrato. Supondo que a concentração de Mg^{2+} utilizada ligue-se ao GTP, a inibição observada a altas concentrações pode ser devida à afinidade intrínseca da enzima pelo metal ou alternativamente devido à baixa dissociação do GDP.

Finalmente, ensaios de expressão do gene da proteína Bradeiona α não geraram resultados satisfatórios. Em todas as situações analisadas, não foi possível detectar proteína recombinante (solúvel ou insolúvel). Este resultado negativo pode ser decorrente da

existência de codóns raros para *E. coli* na seqüência da Bradeiona α, impedindo que a bactéria reconheça o cDNA subclonado. A estrutura primária da Bradeiona α é constituída por um grande número de aminoácidos hidrofóbicos e uma grande quantidade de prolinas (27 prolinas, 13%), que supostamente conferem a essa molécula características singulares. A função biológica da proteína Bradeiona α ainda é desconhecida, porém é conhecida sua importante relação com alguns estados cancerosos [26,27].

Dados os resultados obtidos, as propostas de continuidade deste trabalho estão relacionadas abaixo:

1) é de grande importância empregar esforços no refinamento das condições pré-determinadas de cristalização da Bradeiona β, para obtenção de cristais de melhor qualidade. É importante ressaltar que estruturas tridimensionais de septinas e de seus domínios isolados, são totalmente ausentes na literatura científica. Ensaios de cristalização do domínio GTPase também devem ser realizados.

2) ampliar o estudo para outras septinas humanas e seus domínios isolados. A construção compreendendo o domínio GTPase e o domínio *coiled-coil* C-terminal também dever ser considerada;

3) análises da estrutura da proteína Bradeiona β e de seus domínios isolados através da técnica de SAXS (espalhamento a baixo ângulo) para averiguar a forma e o estado de oligomerização são experiências plausíveis que merecem atenção;

4) estudos da especificidade da proteína Bradeiona β (ou do domínio GTPase) por nucleotídeos podem ser realizados por eletroforese capilar. Com este propósito, seria necessário realizar a mutação do aminoácido Asp292 → Asn no motivo conservado G4 da Bradeiona β. Pretendemos averiguar a importância do resíduo Asp292 no papel de reconhecer o anel de guanina do GTP, desse modo, procurando compreender os motivos da baixa especificidade por nucleotídeo de purinas apresentada pela fusão GST+DGTPase2;

4) tentativas de expressão do cDNA da proteína Bradeiona α em células de inseto também podem ser realizadas. Em célula de eucarioto a possibilidade de reconhecimento do cDNA e da produção da proteína heteróloga na forma solúvel são maiores quando comparadas com expressão em células de procarioto (bactérias);

5) estudos de espectroscopia de fluorescência no domínio GTPase podem ser realizados para averiguar mudanças conformacionais durante a ligação e hidrólise do GTP. O domínio GTPase definido possui em sua estrutura primária dois triptofanos (W) que podem ser mutados para experimentos futuros;

6) estudos através de métodos radiativos ou utilização de nucleotídeos fluorescentes para determinação da constante de dissociação da proteína Bradeiona β. Assim, pretende-se descrever o mecanismo catalítico de septinas.

Referências bibliográficas

Referências bibliográficas

1. Frazier, J. A., Wong, M. L., Longtine, M. S., Pringle, J. R., Mann, M., Mitchison, T. J., and Field, C. (1998) Polymerization of Purified Yeast Septins: Evidence That Organized Filament Arrays May Not Be Required for Septin Function. *J. Cell Biol.* **143,** 737–749.

2. Field, C. M, al-Awar, O., Rosenblatt, J., Wong, M.L., Alberts, D., and Mitchison, T.J. (1996) A purified *Drosophila* septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity. *J. Cell. Biol.* **133**, 605-616.

3. Hsu, S.C., Hazuka, C.D., Roth, R., Foletti, D.L., Heuser, J. and Scheller, R.H. (1998) Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments. *Neuron* **20**, 1111-1122.

4. Gladfelter, A.S., Pringle, J.R. and Daniel J Lew, D.J. (2001) The septin cortex at the yeast mother–bud neck. *Current Opinion in Microbiology* **4**, 681–689.

5. Kinoshita, M. (2003) Assembly of Mammamian Septins. *J. Biochem.* **134**, 491-496.

6. Macara, I. G., Baldarelli, R., Field, C. M., Glotzer, M., Hayashi, Y., Hsu, S. C., Kennedy, M. B., Kinoshita, M., Longtine, M., Low, C., Maltais, L. J., McKenzie, L., Mitchison, T. J., Nishikawa, T., Noda, M., Petty, E. M., Peifer, M., Pringle, J. R., Robinson, P. J., Roth, D., Russell, S. E., Stuhlmann, H., Tanaka, M., Tanaka, T., Trimble, W. S., Ware, J., Zeleznik-Le, N. J., and Zieger, B. (2002) Mammalian Septins Nomenclature. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 4111–4113.

7. Kartmann, B. and Roth, D. (2001) Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis. *Journal of Cell Science* **114**, 839-844.

8. Mantínez, C., Sanjuan, M., Dent, J., Karlsson, L. and Ware, J. (2004) Human septin–septin interactions as a prerequisite for targeting septincomplexes in the cytosol. *Biochem. J.* **382**, 783-791.

9. Bourne, H.R.; Sanders, A. D. and McCormick, F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature,* **349**, 117-127.

10. Larisch, S., Yi, Y., Lotan, Y., Kerner, H., Eimerl, S., Parks, W., Gottfried, Y., Reffey, S., Caestecker, M., Danielpour, D., Melamed, B., Timberg, R., Duckett, C., Lechleider, R. Steller, H., Orly, J., Kim, S. and Roberts, A. (2000) A novel mitochondrial septin-like protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif. *Nature Cell Biology*, **2**, 915-921.

11. Tanaka, M., Tanaka, T., Kijima, H., Itoh, J., Matsuda, T., Hori, S. and Yamamoto, M. (2001) Characterization of tissue- and cell-type-specific expression of a novel human septin family gene, Bradeion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 547-553.

12. Trimble, W.S. (1999) Septins: A Highly Conserved Family of Membrane-Associated GTPases with Function in Cell Division and Beyond. *J. Membrane Biol.* **169**, 75-81.

13. Zhang, J.; Kong, C.; Xie, H.; McPherson, P.S.; Grinstein, S. and Timble, W.S. (1999) Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Current Biology* **9**, 1458-1467.

14. Kinoshita, M., Field, C.M., Coughlin, M.L., Straight, A.F. and Mitchison, T.J. (2002) Self- and Actin-Templated Assembly of Mammalian Septins. *Develop. Cell* **3**, 791-802.

15. Joberty, G., Perlungher, R.R., Sheffield, P.J., Kinoshita, M., Noda, M., Haystead, T. and Macara, I.G. (2001) Borg proteins control septin organisation and are negatively regulated by Cdc42. *Nat. Cell Biol.* **3**, 861–866.

16. Sheffield, P.J., Oliver, C.J., Kremer, B.E., Sheng, S., Shao, Z. and Macara, I. G. (2003) Borg/Septin Interactions and the Assembly of Mammalian Septin Heterodimers, Trimers, and Filaments. *J. Biol. Chem.* **278**, 3483-3488.

17. Adam, J.C., Pringle, J.R. and Peifer, M. (2000) Evidence for functional differentiation among *Drosophila* septins in cytokinesis and cellularization. *Mol. Biol. Cell* **11**, 3123-3135.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

18. Frazier, J. A., Wong, M. L., Longtine, M. S., Pringle, J. R., Mann, M., Mitchison, T. J., and Field, C. (1998) Polymerization of Purified Yeast Septins: Evidence That Organized Filament Arrays May Not Be Required for Septin Function. *J. Cell Biol.* **143,** 737–749.

19. Kinoshita, M., Field, C.M., Coughlin, M.L. and Mitchison, T.J. (unpublished observation).

20. Zhang, B.L., Zhang, Y.Q., Wang, Z.X. and Zheng, Y. (2000) The role of Mg^{2+} cofactor in the guanine nucleotide exchange and GTP hydrolysis reactions of Rho family GTP-binding proteins. *J. Biol.* **275**, 25299-25307.

21. Pan, J.Y., Sanford, J.C. and Wessling-Resnick, M. (1996) Influence of Mg^{2+} on the structure and function of Rab5. *J. Biol. Chem.* **271,** 1322-1328.

22. Ihara, K.; Muraguchi, S.; Kato, M.; Shimizu, T.; Shirakawa, M.; Kuroda, S.; Kaibuchi, K. and Hakoshima, T. (1998), Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. *The Journal of Biological Chemistry*, **273** (16), 9656-9666.

23. Lutkenhaus, J. (2002), Dynamic proteins in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 548-552.

24. Nogales, E., Downing, K.H., Amos, L., and Löwe J (1998), Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nature Struct Biol.* **5**, 451-457.

25. Ihara, M., Tomimoto, H., Kitayama, H., Marioka, Y., Akiguchi, I. Shibasaki, K. Noda, M. and Kinoshita, M. (2003). Association of the cytoskeletal GTP-binding protein Sept4/H5 with cytoplasmic inclusions found in Parkinson's disease and other synucleinopathies. *J. Biol. Chem.* **278**, 24095-24102.

26. Tanaka, T., Kijima, H., Itoh, J., Matsuda, T. and Tanaka, T. (2002) Impaired expression of a human septin family gene Bradeion inhibits the growth and tumorigenesis of colorectal cancer *in vitro* and in vivo. *Cancer Gene Therapy* **9**, 483-488.

27. Tanaka, M., Tomoo, T., Matsuzaki, S., Seto, Y., Matsuda, T., Komori, K., Itoh, J., Kijima, H., Tamai, K., Shibayama, M., Hashimoto, Y. Nakazawa, H. and Toma, H. (2003). Rapid and Quantitative Detection of Human Septin Family Bradeion as a Practical Diagnostic Method of Colorectal and Urologic Cancers. *Med. Sci. Monit.* **9(7)**, CR2-CR9.

28. Yagi, M., Zieger, B., Roth, G. J., and Ware, J. (1998) Structure and expression of the human septin gene HCDCREL-1. *Gene* **212,** 229–236.

29. Kinoshita, M., Kumar, S., Mizoguchi, A., Ide, C., Kinoshita, A., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., and Noda, M. (1997) Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. *Genes Dev.* **11,** 1535–1547.

30. Mori, T., Miura, K., Fujiwara, T., Shin, S., Inazawa, J., and Nakamura, Y. (1996) Isolation and mapping of a human gene (DIFF6) homologous to yeast CDC3, CDC10, CDC11, and CDC12, and mouse Diff6. *Cytogenet. Cell Genet.* **73,** 224–227.

31. Nakatsuru, S., Sudo, K., and Nakamura, Y. (1994) Molecular cloning of a novel human cDNA homologous to CDC10 in Saccharomyces cerevisiae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202,** 82–87.

32. Ausubal, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struthi, K. (1995). Short Protocols in Molecular Biology. 3a ed. USA. *Ed. John Wiley & Sons*, Inc.

33. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, R. (1977) DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA).* **74**, 5463-5467.

34. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

35. Gill, S.C.; von Hippel, P.H. (1989) Calculation of proteins extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem*, **182**, 319-326.

36. GST Gene Fusion System (Handbook) – Amersham Biosciences.

37. Alder A.J.; Greenfield N.J. and Fasman G.D., (1973). Circular dichroism and optical rotary dispersion of proteins and polypeptides. *Meth. Enzymology*, **27**, 675.

38. Sreerama, N. and Woody, R. W. (1993). A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular-dichroism. *Anal. Biochem.* 209, 32-44.

39. Lakowicz, J.R., Principles of Fluorescence Spectroscopy (1983). *Plenum Press*, New York.

40. Berne B. J. and Pecora R., Dynamic light scattering, (1976). *Wiley-interscience* publication.

41. Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin F. and Higgins, D.G. (1997). The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic. Acids Res.*, **22**, 4673-4680.

42. PSIPRED – Jones, D. T. (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.*, **292**, 195-202.

43. Mejilano, M.R., Shivanna, B.D. and Himes, R.H. (1996). Studies on the nocodazole-induced GTPase activity of Tubulin. *Archives in Biochemistry and Biophysics* **33**, 130-138.

44. Okada, D., Tsukida, K. and Ikai, A. (1985). Functional Properties of Cattle Rhodopsin in Soluble Conples with phospholipids and deoxycholate. *Phochemistry and Photobiology* **42**, 405-411.

45. Kawata, H.; Kuroda, K.; Endo, Y.; Inoue, Y. and Endo, G. (2000) Simple and Rapid Determination of GTPase Activity by Capillary Electrophoresis without Radioisotope. *Tohoku J. Exp. Med.*, **192**, 67-79.

46. CANTOR

47. Seckler, R.; Wu, G. M. and Timasheff, S. N. (1990) Interactions of tubulin with guanylyl-(β-γ- Methylene)diphosphate. *J. Biol. Chem.* **265**, 7655-7661.

48. Giacovazzo, C. The Diffraction of X-Ray by Crystal. In: Fundamental of Crystallography (2002). Editado por Giacovazzo, C. IUCr e Oxford Science Publication, New York.

49. Blundell, T.L. and Johnson, L.N. Protein Crystallography (1976). London, Academic Press Inc.

50. Drenth, J. (1999). Principles of Protein X-Ray Crystallography. 2nd ed. Springer, New York.

51. McPherson, A. (1982). Preparation and Analysis of Protein Crystals. Wiley, New York.

52. Tsai, J., Taylor, R., Chothia, C. and Gerstein, M. (1999). The Packing Density in Proteins: Standard radii and volumes. *J. Mol. Biol.* **290**, 253.

53. Jancarik, J. and Kim, S.H. (1991). Sparse Matrix Sampling: a Screening Method for Crystallization of Proteins. *J. Appl. Cryst.* **24**, 409.

54. Gustafsson, C., Govindarajan, S. and Minshull, J. (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in biotechnology*, **22,** 346-353.

55. Field, C.M. and Kellogg, D. (1999) Septins: Structural Polymers or Signaling GTPases? *Trends Cell Biol.* **9**, 387-394.

56. Hoffenberg, S., Sanford, J.C., Liu, S., Daniel, D.S., Tuvin, M., Knoll, B.J., Wesslingresnick, M. and Dickey, B. F. (1995) Biochemical and Functional Characterization of a Recombinant GTPase, Rab5, and Two of Its Mutants. *J. Biol. Chem.* **270**, 5048-5056.

57. John, J., Schlichting, I., Schiltz, E., Rosch, P. and Wittinghofer, A. (1989) C-terminal truncation of p21H preserves crucial kinetic and structural properties. *J. Biol. Chem.* **264**, 13086-13092.

58. Gideon, P., John, J., Frech, M., Lautwein, A., Clark, R. Scheffler, J.E. and Wittinghofer, A. (1992). Mutational and kinetic analyses of the GTPase-activating protein (GAP)- p21 interaction: the C-terminal domain of GAP is not sufficient for full activity. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2050-2056.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

59. Huecas, S. and Andreu, J. M. (2004) Polymerization of nucleotide-free, GDP- and GTP-bound cell division protein FtsZ: GDP makes the difference. *FEBS* **569**, 43-48.

60. Zhao, J., Wang, W.N., Tan, Y.C., Zheng, Y., and Wang, Z.X. (2002) Effect of Mg^{2+} on the kinetics of guanine nucleotide binding and hydrolysis by Cdc42. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**, 653-658.

61. Taylor, J.S.; Vigneron, D.B.; Murphy-Boesch, J.; Nelson, S.J.; Kessler, H.B.; Coia, L.; Curran, W. and Brown, T.R. (1991) Free Magnesium levels in normal human brain and brains tumors – ^{31}P chemical-shift imaging measurements at 1.5 T. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**, 6810-6814.

62. Kay, B.K., Williamson, M.P. and Sudol, M. (2000). The Importance of Being Proline: the Interaction of Proline-Rich Motifs in Signaling Proteins with their Cognate Domains. *FASEB Journal* **14**, 231-241.

63. Casamayor, A. and Snyder, M. (2003). Molecular Dissection of a Yeast Septin: Distinct Domains Are Required for Septin Interection, Localization, and Function. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2762-2777.

64. Shan, S. and Walker, P. (2003). Induced Nucleotide Specificity in a GTPase. *PNAS* **100**, 4480-4485.

65. Scneider, B., Sigalat, C., Amano, T. and Zimmermann, J. (2000). Evidence for changes in the nucleotide conformation in the active site of H^+-ATPase as determined by pulsed EPR spectroscopy. *Biochemistry*, **39**, 15500-15512.

Apêndices

Apêndice A

Vetores de expressão bacterianos utilizados neste trabalho. Um esquema dos vetores de expressão bacterianos pGEX-5X-1e pET8a(+) estão ilustrado nas figura A.1 e A2. Detalhes da região de subclonagem também podem ser observados.

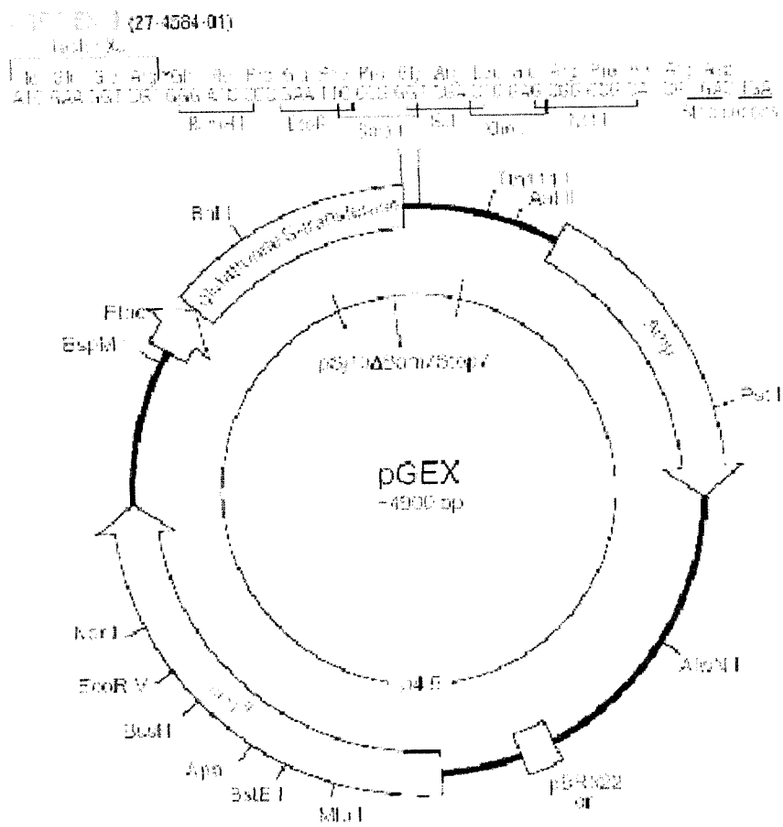


Figura A.1: Vetor de expressão bacteriano pGEX-5X-1 (Amersham). Este vetor permite a expressão da proteína de interesse fusionada a proteína carreadora GST.

SC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

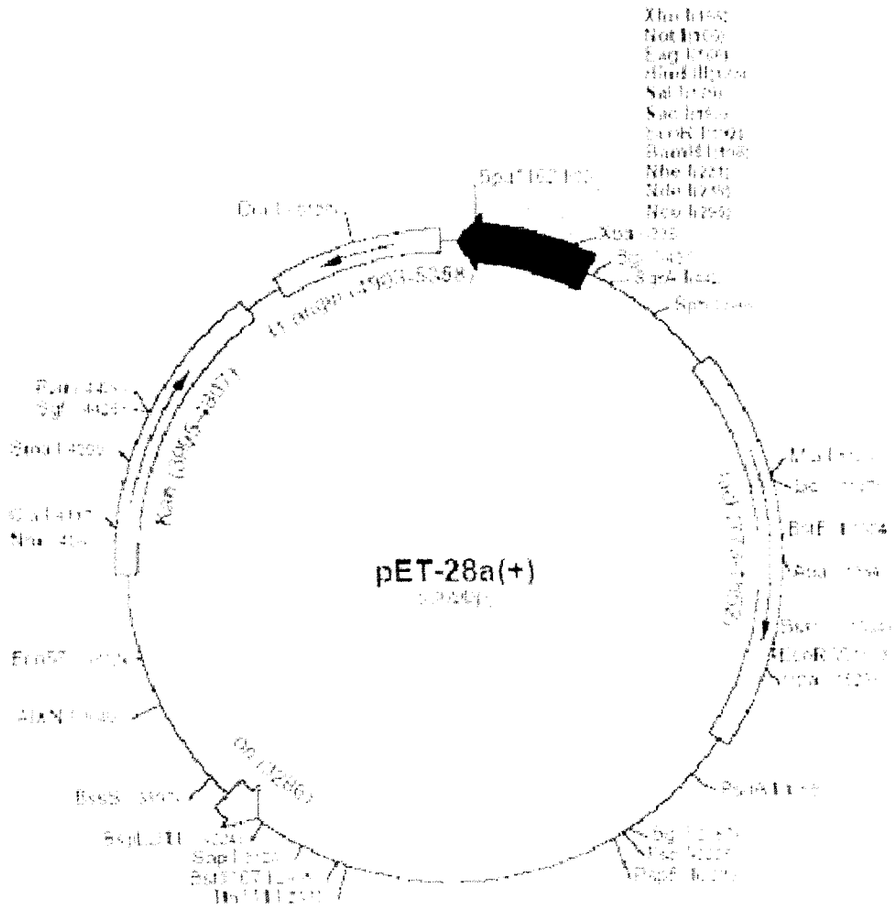


Figura A.2: Vetor de expressão bacteriano pET-28ª(+) (NOVAGEN). Este vetor permite a expressão da proteína de interesse fusionada a um peptídeo com seis histidinas (6xHis *tag*).

Apêndice B

Trabalhos elaborados durante o período de doutoramento:

1) Characterization of the GTPase activity in the recombinant human septin SEPT4 (Bradeion β). Garcia, W., Araújo, A.P.U., Hillebrand, S., Carrilho, E., Tanaka, M., Tanaka, T. and Garratt, R.C. Finalizado para submissão (2005).

2) In vitro monitoring of GTPase activity and enzyme kinetics studies using capillary electrophoresis. Hillebrand, S., Garcia, W., Araújo, A.P.U., Tanaka, M., Tanaka, T., Garratt, R.C. and Carrilho, E. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (07/2005). *In press.*

3) Dissection of a human septin: definition and characterization of distinct domains within human SEPT4. Garcia, W., Araújo, A.P.U., Tanaka, M., Tanaka, T. and Garratt, R.C. A ser submetido (2005).