UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

NATHALIA DE CAMPOS RODRIGUES

**Estudos estruturais do domínio GTPase isolado da septina humana SEPT4 e Estrutura
Cristalográfica da Glutathione -S-Transferase de *Xylella fastidiosa***

São Carlos
2008

NATHALIA DE CAMPOS RODRIGUES

Estudos estruturais do domínio GTPase isolado da septina humana SEPT4 e Estrutura Cristalográfica da Glutathione -S-Transferase de *Xylella fastidiosa*

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

Área de Concentração: Física Aplicada
Opção Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Glacius Oliva

São Carlos
2008

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Rodrigues, Nathalia de Campos

Estudos estruturais do domínio GTPase isolado da septina humana SEPT4 e Estrutura Cristalográfica da Glutathione-S-Transferase de *Xylella fastidiosa*. / Nathalia de Campos Rodrigues; orientador Glaucius Oliva.-- São Carlos, 2008.

99 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Área de concentração: Física Biomolecular – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Septina. 2. Glutathione-S-Transferase . 3. Cristalografia de proteínas. I.Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nathalia de Campos Rodrigues

Dissertação apresentada ao Instituto de Física
de São Carlos da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Física Aplicada – Opção:
Física Biomolecular.

Aprovada em: 31/10/2008

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Glaucius Oliva

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin

Instituição: LNLS

Assinatura

Profa. Dra. Maria Cristina Nonato Costa

Instituição: FFCLRP/USP

Assinatura

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Jonas Martins Rodrigues e Angela Alzira de Campos Rodrigues, por todo apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo carinho, amor e dedicação em todos os momentos.

A Wânus Garcia, João Renato Muniz e Regiane Travensolo pela colaboração científica, discussões e enriquecimento deste trabalho.

Ao professor Glaucius Oliva, por ter me orientado durante o mestrado.

Aos professores Ana Paula Ulian de Araújo, Richard Charles Garratt e Otávio Henrique Thiemann pela disponibilidade e atenção.

A todos os amigos e colegas de trabalho do Grupo de Cristalografia e Grupo de Biofísica.

Aos Técnicos de ambos os grupos, os quais sempre estiveram dispostos a me ajudar.

A todos os “Meninos de Ouro” onde quer que cada um esteja.

Aos meus grandes amigos; Aline Faro, Alessandro Nascimento, Lucas Bleicher, Nayara de Carvalho, Fernando Bachega e Karen Weber.

À Edê (minha segunda mãe) e à Quel (Bichinho) pela companhia, amizade, cumplicidade e muitas risadas durante todo esse tempo morando juntas.

Epígrafe

“Se vi mais longe foi por estar em pé sobre os ombros de gigantes”.

Issac Newton

Resumo

As septinas constituem uma conservada família de proteínas de ligação a nucleotídeos de guanina e formação de heterofilamentos. Em mamíferos, tais proteínas estão envolvidas em uma variedade de processos celulares tais como citocinese, exocitose e tráfego de vesículas. A SEPT4 tem sido identificada em depósitos filamentosos e inclusões citoplasmáticas em Alzheimer e doença de Parkinson, respectivamente. A SEPT4 é a única proteína em associação com proteínas aberrantes em depósitos em ambos os tipos de doenças. Assim, estudos adicionais de propriedades bioquímicas estruturais e funções fisiológicas para a SEPT4 podem promover importantes *insights* em relação ao mecanismo das doenças neurodegenerativas citadas acima. O desenovelamento térmico do domínio GTPase do SEPT4-G revelou um intermediário que agrega rapidamente na forma de fibras tipo amilóide em condições fisiológicas. Neste estudo a análise cinética da agregação do SEPT4-G foi monitorada utilizando fluorescência extrínseca e dicroísmo circular. Com os resultados e análises realizados durante este trabalho de mestrado foi possível compreender com mais detalhes a cinética de formação de agregados tipo amilóide do domínio SEPT4-G. Este trabalho também descreve a cristalização, coleta de dados, resolução e refinamento do modelo cristalográfico para a enzima Glutathione-S-Transferase de *Xylella fastidiosa*. Tal enzima está associada à patogenicidade da bactéria *X. fastidiosa*, responsável por várias doenças em plantas economicamente importantes, incluindo a Clorose Variegada dos Citros (CVC) ou Amarelinho. Algumas análises também foram realizadas após a obtenção do modelo cristalográfico demonstrando as diferenças estruturais entre GSTs bacterianas.

Palavras-chave: Septinas, Glutathione-S-transferase, Espectroscopia, Cristalografia de proteínas

Abstract

The septins are a conserved family of guanine nucleotides-binding and hetero-filament forming proteins. In mammals they are involved in a variety of cellular processes, such as cytokinesis, exocytosis, and vesicle trafficking. SEPT4 has been reported to accumulate in tau-based filamentous deposits and cytoplasmic inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases respectively. Sept4 is unique in its association with the aberrant protein depositions in both types of diseases. Further studies on the biochemical, structural properties and physiological functions of Sept4 may therefore provide important insights into the common mechanism underlying diverse neurodegenerative disorders. Thermal unfolding of the GTPase domain of SEPT4 (SEPT4-G) revealed an unfolding intermediary which rapidly aggregates into amyloid-like fibers under physiological conditions. In this study, the kinetic analysis of aggregation of SEPT4-G was monitored using extrinsic fluorescence and circular dichroism spectroscopy. The aggregates have the ability to bind specific dyes such as Thioflavin-T (ThT), suggesting that they are amyloid in nature. Fibrils formation was monitored by the increase in ThT emission and electron microscopy as a function of temperature, pH, metal ions and protein concentration. Glutathione S-transferases (GSTs) form a group of multifunctional isoenzymes that catalyze the glutathione-dependent conjugation and reduction reactions involved in the cellular detoxification of xenobiotic and endobiotic compounds. GST from *Xylella fastidiosa* (XfGST) was crystallized by the vapour-diffusion method and its crystallography structure was solved for molecular replacement and refined. Afterwards, sequential and structural analyses were carried out for XfGST and others GSTs.

Keywords: Septins, Glutathione-S-transferase, Espectroscopy, Protein Crystallography

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	<i>Modelo para dinâmica de septinas durante o processo de brotamento em <u>S. cerevisiae</u>.</i> a. Localização de septinas observada por microscopia de fluorescência. b. Modelo do heterofilamentos de septinas baseado em fluorescência observada por microscopia de polarização. Antes da citocinese, os heterofilamentos são alinhados ao longo do eixo das células mãe e filha. Durante a citocinese, tais estruturas sofrem uma rotação de 90°. O modelo mostra os heterofilamentos ligeiramente curvados antes da citocinese e estes podem deslizar uns sobre os outros, similar a uma íris, para formar estruturas em anel. (Modificada de Weirich, 2008)	16
Figura 1.2	(A) Diagrama esquemático dos domínios de uma septina. Em azul, domínio N-terminal variável. Em cinza, domínio central GTPase. Os três motivos de interação com nucleotídeo estão representados por G1 (Walker A box), G3 e G4. Em vermelho, domínio <i>coiled-coil</i> . Em preto, região polibásica. (B) Classificação das septinas de mamífero considerando seus domínios estruturais. O domínio GTPase central é altamente conservado apresentando uma similaridade seqüencial mínima de 70%. O domínio C-terminal apresenta uma similaridade seqüencial entre 50-60%(19).	18
Figura 1.3	Imagens obtidas por microscopia de transmissão. Estruturas formadas <i>in vitro</i> pelas septinas de mamífero SEPT2, SEPT6 e SEPT7. A. e B. Heterofilamentos em anéis C. Heterofilamentos em espiral. A barra de escala em A. representa 100 nm e as demais 500 nm (22).	19
Figura 1.4	Representação dos três monômeros de SEPT2-G encontrados no cristal com as interfaces diméricas indicadas (Dímero G e Dímero NC) (23).	20
Figura 1.5	<i>Heterofilamento de septina.</i> Representação de superfície da unidade básica hexamérica. A vizinhança do hexamêro marca os contatos longitudinais utilizando SEPT7 (em cinza), deste modo formando os filamentos de septina. A natureza dos nucleotídeos nas subunidades está indicada (GTP ou GDP). A possível orientação do C-terminal predita como <i>coiled coil</i> é mostrada esquematicamente (23).	21
Figura 1.6	Modelo estrutural de um <i>protofilamento de beta amilóide</i> Representação da estrutura secundária; resíduos de 12-24 representados em vermelho e 30-40 em azul (29).	22
Figura 1.7	(A). Representação esquemática do mecanismo de formação de fibrilas tipo amilóide proposto para o domínio GTPase da septina humana SEPT4, (●) representa o nucleotídeo de guanina. (B). Imagem de microscopia eletrônica das fibras tipo amilóide formadas pelo SEPT4-G incubado a 37° C por 30 minutos. (cedida por Garcia, W).	23
Figura 1.8	Estrutura química do composto Tioflavina T.	24
Figura 1.9	Representação esquemática de uma folha beta, baseada no que foi mostrado por Branden e Tooze. Os átomos da cadeia principal são indicados como (N, C e Cα) e a cadeia lateral (R) para um resíduo. Ligações de hidrogênio não são indicadas e este esquema é válido tanto para folha paralelas como anti-paralelas. Considerando tal representação parte de uma fibrila, o eixo maior da fibrila seria perpendicular a está página. Um dos canais de ligação ao ThT está indicado por uma flecha de duas pontas (34).	25
Figura 3.1	Vetor de expressão bacteriano pET-28a(+). Este vetor permite a expressão da proteína de interesse fusionada a um peptídeo com seis histidinas (6xHis tag).	28

Figura 3.2	Seqüência primária da septina 4 humana destacando em cinza o domínio GTPase, (resíduos 144 a 416) com 273 resíduos. Os motivos de ligação ao nucleotídeo estão destacados em vermelho.	28
Figura 3.3	Espectros de dicroísmo circular para hélice α (vermelho), folha β (verde) e uma região de seqüência aleatória <i>random-coil</i> (preto) para uma cadeia polipeptídica.	32
Figura 4.1	Expressão e purificação do produto recombinante do SEPT4-G. 1. Padrão de massa molecular. 2. Cultura não-induzida 3. Cultura induzida 4. Fração insolúvel 5. Fração solúvel. 6. Lavagem da resina de afinidade com tampão acrescido de 10 mM de imidazol. 7. Eluição da proteína de interesse com tampão acrescido de 100 mM imidazol. 8-10. Domínio SEPT4-G após cromatografia de exclusão molecular.	36
Figura 4.2	Cromatografia de exclusão molecular do SEPT4-G (25 mM Tris-HCl, pH 7,8; 0,1 mM GDP; 10% glicerol; 100mM Imidazol) purificada na Superdex-200	37
Figura 4.3	Emissão do ThT em 482 nm. Medidas realizadas em diferentes concentrações e 50 μ M de ThT a 30 °C.	39
Figura 4.4	Emissão do ThT em 482 nm. Amostras incubadas a 30 °C durante 30 min. antes do início da medida. Medidas realizadas com o SEPT4-G em diferentes concentrações e 50 μ M de ThT a 30 °C	39
Figura 4.5	Espectro de dicroísmo circular (CD) do domínio recombinante SEPT4-G. Medidas realizadas com 4 μ M do SEPT4-G e 2 mM de sal a 16°C.	40
Figura 4.6	Emissão do ThT em 482 nm. Medidas realizadas com 13 μ M de SEPT4-G, 50 μ M de ThT e 2 mM de sal a 30 °C	40
Figura 4.7	Emissão do ThT em 482 nm. Medidas realizadas com 13 μ M do SEPT4-G, 50 μ M de ThT a 30 °C	42
Figura 4.8	Espectros de dicroísmo circular (CD) do domínio recombinante SEPT4-G. Medidas realizadas com 6 μ M do SEPT4-G a 16°C.	43
Figura 4.9	Emissão do ThT em 482 nm em função do pH. Medidas realizadas com 4,5 μ M do SEPT4-G, 50 μ M de ThT a 30 °C	44
Figura 6.1	Imagem de microscopia eletrônica mostrando <i>X. fastidiosa</i> aderidas às paredes do vaso xilema de <i>Citrus</i> . (Modificado de http://aeg.lbi.ic.unicamp.br)	47
Figura 6.2	Comparação de frutos normais com frutos afetados pela CVC: frutos sadios ao lado de frutos de tamanho reduzido devido à doença. (Figura adaptada de http://www.fundecitrus.com.br)	48
Figura 8.1	<i>Representação do experimento de cristalização por difusão de vapor em gotas suspensas.</i> A gota contendo a proteína em solução apresenta igual composição ao reservatório do poço, porém, com metade da concentração. Dessa forma, a gota tende a perder solvente lentamente, até que as concentrações da gota e do poço adquiram uma condição de equilíbrio.	54
Figura 9.1	Cristal da XfGST recombinante obtido através da técnica de difusão de vapor em gotas suspensas com 100 mM Hepes pH 7,6, 28%(w/v) PEG 6000 como precipitante. Dimensão típica de 0,2x 0,2x 0,2 mm	58
Figura 9.2	Padrão de difração típico do cristal de XfGST para 1° de oscilação para cada exposição. A borda do detector corresponde à resolução de 2, 00 Å	59
Figura 9.3	Resíduos que interagem com a glutatona (GSH) presente no subsítio G da enzima XfGST. Os resíduos indicados com linha (') pertencem à outra molécula do dímero.	62

Figura 9.4	Alinhamento estrutural gerado pelo programa TexShade. O grau de conservação é dado em um gradiente do preto ao cinza. Os resíduos que participam da interface entre as moléculas do dímero estão destacadas em verde e os resíduos de interação com GSH estão identificados pelos símbolos (●,*). A estrutura secundária para a XjGST é representada na parte superior do alinhamento.	64
Figura 9.5	Sobreposição das cadeias principais e dos ligantes presentes nas estruturas cristalográficas das GSTs bacterianas analisadas. A. vista frontal. B. vista lateral e C. vista lateral evidenciando um <i>loop</i> adicional existente na XjGST (cadeia representada em laranja)	65
Figura 9.6.	Comparação dos mapas de distribuição de cargas para as GSTs bacterianas analisadas. A superfície molecular está colorida de acordo com sua superfície de potencial eletrostático (do vermelho (-) ao azul (+)).	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Oligonucleotídeos utilizados para a subclonagem do domínio SEPT4-G no vetor de expressão pET28a(+). Os sítios de restrição encontram-se destacados em azul e o códon de parada em vermelho.	27
Tabela 3.2	Parâmetros pertinentes para o domínio recombinante SEPT4-G	31
Tabela 9.1	Parâmetros do cristal e estatísticas do processamento de dados. Os valores em parênteses correspondem à camada de mais alta resolução.	59
Tabela 9.2	Estatísticas do refinamento do modelo da XjGST	61

Sumário

Parte 1	15
Estudos estruturais do domínio GTPase isolado da septina humana SEPT4	15
Capítulo 1	15
Introdução	15
1.1. Família Septinas	16
1.2. Septinas e formação de heterofilamentos	19
1.3. Septina 4 e Patologias	21
Capítulo 2	26
Objetivos	26
Capítulo 3	27
Metodologia	27
3.1. Expressão e Purificação do domínio SEPT4-G	27
3.2. Cálculo da Concentração Protéica	30
3.3. Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)	31
3.4. Espectroscopia de fluorescência	33
3.5. Ensaio de cristalização	35
Capítulo 4	36
Resultados e Discussão	36
4.1. Expressão e Purificação do domínio SEPT4-G	36
4.2. Análise da propensão em formar filamentos do SEPT4-G	37
4.3. Ensaio de Cristalização do domínio SEPT4-G	44
Capítulo 5	45
Conclusão e Perspectivas futuras	45
Parte 2	46
Estrutura Cristalográfica da Glutathione -S-Transferase de <i>Xylella fastidiosa</i>	46
Capítulo 6	47
Introdução	47
6.1. <i>Xylella fastidiosa</i> e Clorose Variegada dos Citros (CVC)	47
6.2 Glutathione-S-transferases (GSTs)	49
Capítulo 7	52
Objetivos	52
Capítulo 8	53
Metodologia	53
8.1. Cristalização de macromoléculas	53
8.2. Coleta e processamento dos dados de difração de raios X	55
8.3. Substituição Molecular	56
8.4. Refinamento Cristalográfico	56
8.5. Análises Sequenciais e Estruturais	57
Capítulo 9	58
Resultados e Discussão	58
9.1. Cristalização e processamento dos dados de difração de raios X	58
9.2. Substituição Molecular	59
9.3. Refinamento Cristalográfico	60
9.4. Análises Sequenciais e Estruturais	61
Capítulo 10	68
Conclusão e Perspectivas futuras	68
Capítulo 11	70
Considerações Finais	70

Referências	71
Anexos	77

Parte 1

Estudos estruturais do domínio GTPase isolado da
septina humana SEPT4

Capítulo 1

Introdução

“O screen para genes envolvidos na divisão celular em levedura realizado por Hartwell e Nurse identificou doze genes fundamentais para este processo. Estes genes Cdc (ciclo de divisão celular) expressos durante o processo de brotamento, tanto na constrição quanto na fissão da célula, possuíam alelos mutantes que causavam deficiência na citocinese. Um subconjunto desses genes é agora conhecido como septinas, um termo cunhado por John Pringle e colaboradores. Anteriormente, Byers e Goetsch haviam identificado um conjunto de estruturas filamentosas associadas com o processo de septação durante o brotamento em Saccharomyces cerevisiae, atualmente sabe-se que tais estruturas são compostas de septinas polimerizadas.

Durante a última década, um conhecimento considerável foi acumulado a respeito de septinas de levedura e proteínas similares em outros fungos, indicando um papel na citocinese e em outros processos celulares essenciais. Assim como muitos genes Cdc, septinas são agora conhecidas como sendo conservadas através da filogenia eucariótica desde leveduras unicelulares até metazoários complexos incluindo Homo sapiens.” (1)

1.1. Família Septinas

As septinas constituem uma conservada família de proteínas de ligação a nucleotídeos de guanina e formação de heterofilamentos as quais estão presentes em fungos e em eucariotos com exceção de plantas (2). Tais proteínas foram inicialmente identificadas em *Saccharomyces cerevisiae* como proteínas envolvidas no processo de brotamento (3). A localização e atuação de septinas neste processo são ilustradas na figura 1.1.

Figura 1.1. Modelo para dinâmica de septinas durante o processo de brotamento em *S. cerevisiae*. **a.** Localização de septinas observada por microscopia de fluorescência. **b.** Modelo do heterofilamentos de septinas baseado em fluorescência observada por microscopia de polarização. Antes da citocinese, os heterofilamentos são alinhados ao longo do eixo das células mãe e filha. Durante a citocinese, tais estruturas sofrem uma rotação de 90°. O modelo mostra os heterofilamentos ligeiramente curvados antes da citocinese e estes podem deslizar uns sobre os outros, similar a uma íris, para formar estruturas em anel. (Modificada de Weirich, 2008) (4).

Embora identificadas primeiramente como mutantes do ciclo celular com deficiência na citocinese, atualmente sabe-se que septinas atuam em outros processos incluindo a determinação e manutenção da polaridade celular (5-8), reorganização do citoesqueleto, dinâmica de membranas, tráfego de vesículas, exocitose (9-13) e até mesmo apoptose (14).

A nomenclatura de septinas tem sido problemática com o uso de muitos termos diferentes. Porém, em 2002, Ian Macara e colaboradores propuseram uma nomenclatura padrão para septinas de mamíferos que consiste em uma nomenclatura simples dando a cada septina um número e denotando a isoforma maior pelo sufixo ‘_v1’ (15). Apesar de ainda não universalmente empregada, esta tem resolvido muitos dos problemas com nomenclatura de septinas de mamíferos. Já para outras espécies permanece o excesso de termos cuja origem é histórica.

A família septinas possui um conservado domínio de ligação a GTP e pertence à grande superclasse de P-loop GTPases (16). Todas as septinas têm um P-loop que é definido pelo motivo Walker A ou G1 (GxxGxGKST), Walker B ou G3 (DxxG), e o motivo G4 específico para GTP (xKxD) (17,18). Estas proteínas pertencem à subclasse TRAFAC de P-loop GTPases definida por uma treonina requerida para a hidrólise do trifosfato.

A sequência de todos os membros desta família de proteínas pode ser dividida em três domínios: um N-terminal variável, o domínio central GTPase e uma região C-terminal que inclui geralmente sequências características de *coiled-coil* como esquematizado na figura 1.2 A (19). O domínio central GTPase, como mencionado acima, é bastante conservado (>35% de identidade sequencial entre septinas homólogas de levedura e mamíferos, por exemplo), porém os domínios N- e C- terminal apresentam grande variação. A identidade sequencial entre os domínios GTPases de septinas da mesma espécie é consideravelmente alta, com uma similaridade mínima de 70% (20). A classificação das septinas em quatro grupos considerando seus domínios estruturais pode ser observada na figura 1.2 B.

Figura 1.2. (A) Diagrama esquemático dos domínios de uma septina. Em azul, domínio N-terminal variável. Em cinza, domínio central GTPase. Os três motivos de interação com nucleotídeo estão representados por G1 (Walker A box), G3 e G4. Em vermelho, domínio coiled-coil. Em preto, região polibásica. (B) Classificação das septinas de mamífero considerando seus domínios estruturais. O domínio GTPase central é altamente conservado apresentando uma similaridade seqüencial mínima de 70%. O domínio C-terminal apresenta uma similaridade seqüencial entre 50-60% (19).

Septinas são bem conservadas no clado dos vertebrados e o número de septinas aumentou possivelmente por eventos de duplicação gênica, tanto que em mamíferos, incluindo o homem há 14 genes distintos de septinas conhecidos até o momento. É impressionante que haja grande variação no comprimento das regiões N- e C-terminais que cercam o domínio de ligação a GTP. Em muitos casos, há um extensivo *splicing* alternativo

dando origem a muitos transcritos distintos e, portanto, a diferentes isoformas. Em nenhum dos casos a importância funcional destas características é compreendida em detalhes (1).

1.2. Septinas e formação de heterofilamentos

Septinas são conhecidas por polimerizar formando estruturas hetero-oligoméricas que podem formar filamentos altamente ordenados *in vitro* e *in vivo*. Estruturas homo-oligoméricas também foram observadas *in vitro*, porém sua função biológica é bastante discutível. Septinas purificadas de leveduras reúnem-se em heterofilamentos de comprimento variável e diâmetro de 7-9 nm (2). Heterofilamentos similares têm sido isolados de *Drosophila* e tecido cerebral de mamíferos (21, 9). Tais estruturas podem ser observadas na figura 1.3.

Figura 1.3. Imagens obtidas por microscopia de transmissão. Estruturas formadas *in vitro* pelas septinas de mamífero SEPT2, SEPT6 e SEPT7. **A.** e **B.** Heterofilamentos em anéis **C.** Heterofilamentos em espiral. A barra de escala em **A.** representa 100 nm e as demais 500 nm (22).

O trabalho de Sirajuddin *et al.* (23) mostra que a sucessão de domínios GTPase de septinas serve como unidades fundamentais para a formação do filamento *in vitro* em contraste com os modelos anteriormente publicados. Os filamentos podem ser formados por um número variado de subunidades utilizando apenas uma ou combinações diferentes de septinas para a formação de homo ou heterofilamentos, respectivamente (23). Este trabalho descreve e analisa as estruturas cristalográficas do domínio GTPase da septina humana SEPT2 (SEPT2-G) e do complexo heterotrimérico composto pelas septinas SEPT2, SEPT6 e SEPT7 inteiras. A construção SEPT2-G possui 315 resíduos, o que consiste em 46 resíduos a menos na porção C-terminal em relação a esta proteína inteira. A figura 1.4 mostra a representação do filamento formado pelo domínio GTPase da septina humana SEPT2 (SEPT2-G). O polímero formado pelo domínio SEPT2-G possui duas interfaces descritas no trabalho como dímero G e dímero NC; o primeiro apresenta interações entre os sítios de ligação a nucleotídeos adjacentes e no dímero NC as interações ocorrem por extensões N e C terminais.

Figura 1.4. Representação dos três monômeros de SEPT2-G encontrados no cristal com as interfaces diméricas indicadas (Dímero G e Dímero NC) (23).

O complexo hexamérico formado pelas septinas humanas SEPT2, SEPT6 e SEPT7 também apresentam interfaces G e NC assim como a estrutura do domínio SEPT2-G. A figura 1.5 mostra a representação deste heterofilamentos. Imagens de ME mostram que a estrutura do filamento no cristal é a mesma em solução.

Figura 1.5. *Heterofilamento de septina.* Representação de superfície da unidade básica hexamérica. A vizinhança do hexâmero marca os contatos longitudinais utilizando SEPT7 (em cinza), deste modo formando os filamentos de septina. A natureza dos nucleotídeos nas subunidades está indicada (GTP ou GDP). A possível orientação do C-terminal predito como *coiled coil* é mostrada esquematicamente (23).

1.3. Septina 4 e Patologias

O interesse no possível papel de septinas em desordens neurológicas originou-se de várias observações incluindo expressão cérebro-específica de algumas septinas, a regulação diferencial de septinas no desenvolvimento neural, e a associação de septinas com vários estados patológicos (1).

O gene SEPT4, localizado na posição cromossômica 17q23 é fisiologicamente expresso principalmente em tecido cerebral normal (24,25). No entanto, sua expressão também é observada em certas condições patológicas como em câncer colo-retal, urológico e melanoma maligno (25,26). Este perfil de expressão relacionado à patologia nunca foi

observado entre outros membros da família de septinas de mamíferos. Além disso, SEPT4 associada à SEPT1 e SEPT2 são acumuladas em depósitos de filamentos conhecidos como emaranhado de neurofibrilas e fibrilas gliais em mal de Alzheimer (27). A proteína SEPT4 também está envolvida na formação de corpos de inclusão citoplasmáticos bem como na indução da morte celular em desordens neurodegenerativas associadas a α -sinucleína como a doença de Parkinson (28).

Um grande número de doenças humanas origina-se da deficiência de peptídeos ou proteínas específicas em adotar ou permanecer em seu estado conformacional funcional ativo (29). Este grupo de doenças está associado à conversão de estados peptídicos ou protéicos solúveis e funcionais para agregados fibrilares altamente organizados. Estas estruturas são geralmente descritas como fibrilas amilóides (30). Cada protofilamento individual (unidade constituinte da fibrila amilóide) da molécula de proteína ou peptídeo está arranjado de maneira que a cadeia polipeptídica forma uma folha β que corre perpendicularmente ao longo do eixo da fibrila (31), o que pode ser observado na figura 1.6.

Figura 1.6. Modelo estrutural de um *protofilamento de beta amilóide* Representação da estrutura secundária; resíduos de 12-24 representados em vermelho e 30-40 em azul (29).

Fibrilas, representantes do núcleo estrutural do amilóide, podem ser isoladas de pacientes. Fibrilas muito similares àsquelas de isolados clínicos podem ser produzidas *in vitro* utilizando proteínas naturais ou recombinantes, nestes casos, condições semi-desnaturantes

são geralmente requeridas para sua rápida formação, pelo menos para proteínas que normalmente adotam um enovelamento bem definido (29).

O domínio GTPase em septinas é altamente conservado e sabe-se que a formação de filamentos envolve este domínio. Experimentos anteriores de desenovelamento térmico realizados por Garcia, et al. (32) permitiram a identificação de uma estrutura intermediária do domínio recombinante SEPT4-G capaz de formar fibras tipo amilóide *in vitro*. De acordo com os resultados obtidos por Garcia, et al. foi proposto o mecanismo representado na figura 1.7 A. Neste mecanismo temos inicialmente o domínio em sua conformação nativa ligada ao nucleotídeo, uma perturbação no sistema, como por exemplo, o aumento da temperatura, resulta na formação de uma estrutura intermediária a qual não apresenta o nucleotídeo ligado e estas unidades são capazes de se organizar em fibrilas tipo amilóide. Estas fibrilas também puderam ser observadas por microscopia eletrônica (figura 1.7 B)

Figura 1.7. (A). Representação esquemática do mecanismo de formação de fibrilas tipo amilóide proposto para o domínio GTPase da septina humana SEPT4, (●) representa o nucleotídeo de guanina. (B). Imagem de microscopia eletrônica das fibras tipo amilóide formadas pelo SEPT4-G incubado a 37° C por 30 minutos. (cedida por Garcia, W).

Muitos dos experimentos descritos neste trabalho envolvem a análise da propensão a formar fibras tipo amilóide verificada para o domínio recombinante SEPT4-G. A formação dessas estruturas foi monitorada através de medidas da fluorescência emitida pela sonda fluorescente Tioflavina-T (ThT) ao interagir com as fibrilas, como função de diversos parâmetros (temperatura, força iônica, pH, etc.).

O composto ThT é um sal de benzotiazol obtido pela metilação de dihidrotiotoluidina com metanol na presença de ácido hidrocloreídrico. A estrutura química do ThT pode ser observada na figura 1.8.

Figura 1.8. Estrutura química do composto Tioflavina T.

Esta sonda fluorescente é um marcador clássico utilizado para visualizar placas compostas de β -amilóide encontradas em cérebro de pacientes com mal de Alzheimer. Quando o ThT liga-se a folhas β , assim como em seus oligômeros amilóides, sofre uma alteração característica de 120 nm em seu espectro de excitação, que pode ser seletivamente excitado a 450 nm, resultando em um sinal de fluorescência a 482 nm (33). A figura 1.9 mostra uma representação esquemática de uma folha beta e um dos canais de ligação do ThT é indicado por uma flecha de duas pontas.

Figura 1.9. Representação esquemática de uma folha beta, baseada no que foi mostrado por Branden e Tooze. Os átomos da cadeia principal são indicados como (N, C e C α) e a cadeia lateral (R) para um resíduo. Ligações de hidrogênio não são indicadas e este esquema é válido tanto para folha paralelas como anti-paralelas. Considerando tal representação parte de uma fibrila, o eixo maior da fibrila seria perpendicular a esta página. Um dos canais de ligação ao ThT está indicado por uma flecha de duas pontas (34).

Doença de Parkinson e mal de Alzheimer apresentam considerável sobreposição em suas características clínico-patológicas, portanto tem sido proposto que mecanismos moleculares comuns possam explicar tais doenças neurodegenerativas. A SEPT4 é a única proteína em associação com proteínas aberrantes em depósitos em ambos os tipos de doenças (28). Portanto estudos adicionais de propriedades bioquímicas, estruturais e funções fisiológicas de SEPT4 podem promover importantes *insights* em relação ao mecanismo das doenças neurodegenerativas citadas acima.

Capítulo 2

Objetivos

O desenovelamento térmico do domínio GTPase da proteína SEPT4 (SEPT4-G) revelou um estado intermediário que agrega rapidamente formando fibras tipo amilóide sob condições fisiológicas (32). Este trabalho foi proposto a partir destes resultados, tendo como objetivo analisar a propensão a formar agregados amorfos e/ou amilóides em função de diferentes condições. Assim, os objetivos principais deste trabalho foram:

- i) Expressar o SEPT4-G em *E. coli* e purificar o produto recombinante através de cromatografia de afinidade seguida de cromatografia de exclusão molecular;
- ii) Realizar o estudo da estabilidade estrutural da SEPT4-G através de espectroscopia de dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência, em função de diferentes condições físico-químicas;
- iii) Analisar a propensão a formar agregados amorfos e/ou amilóides em função de diversos parâmetros através da utilização da sonda fluorescente ThT;
- iv) Realizar ensaios de cristalização para obtenção de cristais do SEPT4-G.

Capítulo 3

Metodologia

3.1. Expressão e Purificação do domínio SEPT4-G

A construção do domínio SEPT4-G utilizada neste trabalho foi determinada anteriormente quanto ao número de resíduos por Garcia *et al.* (35).

Os oligonucleotídeos utilizados para a subclonagem do domínio GTPase da SEPT4 no vetor pET28a(+) encontram-se na tabela 3.1. E o vetor de expressão bacteriano pET-28a(+) está representado na figura 3.1.

Tabela 3.1 - Oligonucleotídeos utilizados para a subclonagem do domínio SEPT4-G no vetor de expressão pET28a(+). Os sítios de restrição encontram-se destacados em azul e o códon de parada em vermelho.

Oligonucleotídeo	Enzimas de Restrição	Seqüências dos oligos 5'-3'
SEPT4-G <i>sense</i> ''	<i>NdeI</i>	GGAATTCCATATGGACTTTACCCATCATGGTGGCA
SEPT4-G <i>antisense</i> ''	<i>BamHI</i>	CGGGATCCTCAGGTCATGCTCTGGATGCACTGT

Figura 3.1. Vetor de expressão bacteriano pET-28a(+). Este vetor permite a expressão da proteína de interesse fusionada a um peptídeo com seis histidinas (6xHis tag).

A figura 3.2 mostra a sequência de aminoácidos da septina 4 humana e os resíduos que compreende o domínio SEPT4-G.

1	MDRSLGWQGN	SVPEDRTEAG	IKRFLEDTTD	DGELSKFVKD	FSGNASCHPP	EAKTWASRPQ
61	VPEPRPQAPD	LYDDDLLEFRP	PSRPQSSDNQ	QYFCAPAPLS	PSARPRSPWG	KLDPYDSSD
121	DKEYVGFATL	PNQVHRKSVK	KGFDFTLMVA	<u>GESGLGKSTL</u>	VNSLFLTDLY	RDRKLLGAEE
181	<u>RIMQTVEITK</u>	HAVDIEEKGV	RLRLTIVDTP	GFGDAVNNT	CWKPVAEYID	QQFEQYFRDE
241	SGLNRKNIQD	NRVHCCLYFI	SPFGHGLRPL	DVEFMKALHQ	RVNIVPILAK	<u>ADTLTPPEVD</u>
301	HKKRKIREEI	EHFGIKIYQF	PDCDSDEDED	FKLQDQALKE	SIPFAVIGSN	TVVEARGRRV
361	RGRLYPWGIV	EVENPGHCDF	VKLRTMLVRT	HMQDLKDVT	ETHYENYRAQ	<u>CIQSMTRLVV</u>
421	KERNRNKLTR	ESGTDFPIPA	VPPGTDPETE	KLIREKDEEL	RRMQEMLHKI	QKQMKENY

Figura 3.2. Sequência primária da septina 4 humana destacando em cinza o domínio GTPase, (resíduos 144 a 416) com 273 resíduos. Os motivos de ligação ao nucleotídeo estão destacados em vermelho.

A expressão heteróloga do produto recombinante foi realizada em células de *E. coli* BL21(DE3) contendo o vetor de expressão bacteriano pET-28a(+) e o cDNA do SEPT4-G.

Uma colônia isolada foi individualmente inoculada em 5 mL de meio LB acrescido de canamicina (50 µg/mL) e incubada sob agitação (250 rpm) a 37 °C durante 12 h. A seguir inoculou-se o volume total da cultura anterior em um frasco com 500 mL de meio LB e canamicina (50 µg/mL) 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 IPTG (0,4 mM de concentração final) e o frasco incubado novamente a 18 °C sob agitação. Outra amostra de 200 µL foi retirada após o período de indução representando a cultura induzida. As amostras referentes à cultura não-induzida e induzida foram centrifugadas por 1 min., sob velocidade máxima em microcentrífuga (Eppendorf 5415 D), 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 durante 5 min. Em seguida, um total de 10 µL de cada uma das amostras foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE 15%) segundo o método de Laemmli (36). Os marcadores de massa molecular utilizados foram: Albumina sérica (66 kDa), Ovalbumina (45 kDa), Anidrase Carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20 kDa) e citocromo c (12 kDa).

Após 13 h de indução a 18 °C, as células referentes a 500 mL de cultura foram centrifugadas a 6.000xg (4°C) durante 10 min. e o precipitado ressuspense em 20 mL de solução tampão contendo 25 mM Tris-HCl pH 7,8 e 10% de glicerol (tampão A). Em seguida, adicionou-se lisozima (0,5 mg/mL) e GDP (0,1 mM) deixando a mistura em gelo por aproximadamente 30 min.. A lisozima age sobre a parede celular da bactéria desestruturando a mesma. Em seguida utilizou-se ultra-som (sonicação) para romper definitivamente as células. Sonicou-se a mistura por 8 vezes de 15 s (média potência) com intervalos de 15 s,

mantendo a mistura em gelo durante todo o processo. Após a lise, a mistura foi submetida a uma nova centrifugação a 30.000xg (4°C) durante 30 min. e o precipitado foi separado do sobrenadante. O sobrenadante, com o produto recombinante possuindo uma cauda de histidinas (*His-tag*), foi então filtrado e aplicado em uma coluna de afinidade Ni-NTA com 4 mL de resina de níquel. Após a passagem do sobrenadante, lavou-se a resina com 20 mL do tampão contendo 25 mM Tris-HCl pH 7,8; 10% de glicerol e 0,1 mM de GDP (tampão B), e em seguida com o mesmo volume deste tampão contendo 10 mM de imidazol para a retirada dos possíveis contaminantes com baixa afinidade à resina. Para a eluição da proteína de interesse, utilizou-se o tampão B acrescido de 100 mM de imidazol. A proteína eluída da coluna de níquel foi concentrada (3.000 xg; 4 °C) utilizando um concentrador Millipore com membrana de 10 kDa e posteriormente aplicada a uma coluna de exclusão molecular Superdex 200 acoplada a um sistema HPLC (ÄKTA Purifier - GE Healthcare). A coluna foi pré-equilibrada e eluída com o tampão A sob um fluxo de 0,5 mL/min. A amostra foi eluída no mesmo tampão e monitorada pela absorbância no comprimento de onda de 280 nm.

3.2. Cálculo da Concentração Protéica

A concentração da proteína recombinante foi determinada através de absorção no comprimento de onda de $\lambda = 280\text{nm}$, em um espectrofotômetro Hitachi U-2001, utilizando o coeficiente de extinção teórico (ϵ) calculado através da análise da composição dos aminoácidos da estrutura primária (37). O coeficiente de extinção teórico calculado para SEPT4-G foi $\epsilon_{280} = 21.980 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A Tabela 3.2 exhibe alguns parâmetros pertinentes para o domínio SEPT4-G.

Tabela 3.2 - Parâmetros pertinentes para o domínio recombinante SEPT4-G

M.M. (Da)	ϵ_{280} (M ⁻¹ cm ⁻¹)	pI	Resíduos Fluorescentes
31.587,9	21.980	5,77	2W, 13 F, 8Y

3.3. Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

Os espectros de CD de proteínas são usualmente medidos em duas regiões: na região do ultravioleta (UV) próximo e na região do ultravioleta distante. Na região do UV próximo (intervalo para o comprimento de onda entre $\lambda = 250\text{-}300$ nm), pode-se monitorar a contribuição dos aminoácidos aromáticos e também das pontes dissulfeto. A região de UV distante (intervalo para o comprimento de onda entre $\lambda = 190\text{-}250$ nm) é dominada pelas transições da cadeia peptídica da proteína. O conjunto oferece informações sobre a estrutura global da proteína. A região do UV distante permite estimar a composição da estrutura secundária e monitorar, em alguns casos, mudanças estruturais. A estrutura secundária é constituída e organizada na forma de hélices α , folhas β , voltas e seqüências aleatórias. Os sinais característicos destas estruturas estão representados na figura 3.3.

O espectro de CD característico de hélices α é identificado por um mínimo negativo em torno de 222 nm correspondente a transição $n\text{-}\pi^*$, um mínimo em torno de 208 nm e um máximo em torno de 192 nm correspondentes à transição $\pi\text{-}\pi^*$ do peptídeo (Figura 3.3). O espectro de CD característico para folhas β é identificado por um mínimo em torno de 216 nm e um máximo em torno de 195 nm. Para seqüências aleatórias (não ordenadas) o espectro de CD característico é uma forte banda negativa em torno de 200 nm e uma banda positiva próximo de 218 nm (38).

Figura 3.3. Espectros de dicroísmo circular para hélice α (vermelho), folha β (verde) e uma região de sequência aleatória *random-coil* (preto) para uma cadeia polipeptídica.

As análises de CD foram realizadas em um espectropolarímetro J-715, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1 mm de caminho óptico. Todas as amostras medidas foram preparadas com um volume final de 250 μ L.

3.3.1. Medidas de dicroísmo circular em função da presença de diferentes metais

As medidas com o domínio SEPT4-G em função de metais foram realizadas a 16 °C. Os sais de cloreto dos íons metálicos Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} foram preparados em estoque de 1 M com 25 mM Tris pH 7,8. Para um volume total de 250 μ L, 5 μ L de proteína a 300 μ M foram adicionados a 244,5 μ L de tampão A e 0,5 μ L da solução estoque de sal. Assim a concentração protéica e salina final foram de 6 μ M e 2 mM, respectivamente. As medidas foram realizadas 10 min. após a incubação da proteína na solução contendo um determinado sal.

Um total de 32 varreduras, no intervalo de comprimento de onda de 200 a 250 nm, foi efetuado para a determinação de uma média.

3.3.2. Medidas de dicroísmo circular em função do pH

As medidas de dicroísmo circular em função do pH foram realizadas também a 16 °C com um determinado tamponante a 25 mM e 5% de glicerol. As soluções tampão utilizadas foram: Glicina pH 3,0; Ac. Acético pH 4,0; Ac. Acético pH 5,0; Bis-Tris pH 6,0; Tris pH 7,0; Tris pH 8,0; Tris pH 9,0 e Glicina pH 10,0.

Para um volume total de 250 μ L, 5 μ L de proteína a 300 μ M foram adicionados a 240 μ L de solução tampão, sendo a concentração protéica final na cubeta de 6 μ M. As medidas foram realizadas 10 min. após a incubação da proteína em um determinado pH. Neste experimento, a proteína estoque em alta concentração é necessária para que se possa utilizar um volume pequeno desta e assim não interferir no valor do pH em que se quer medir tal amostra.

Um total de 32 varreduras, no intervalo de comprimento de onda de 195 a 250 nm, foi efetuado para a determinação de uma média.

3.4. Espectroscopia de fluorescência

As medidas de fluorescência foram realizadas em um fluorímetro K2 ISS equipado com um controle de temperatura, utilizando cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Todas as amostras medidas foram preparadas com um volume final de 400 μ L.

A análise da propensão a formar agregados amorfos e/ou amilóides em função de parâmetros como temperatura, pH, concentração protéica e presença de metais foi realizada através da utilização da sonda fluorescente Tioflavina T (ThT). O ThT sofre alterações no seu máximo de emissão quando se liga a uma variedade de fibrilas amilóides, o que não ocorre quando este se liga a precursores polipeptídicos, monômeros ou agregados amorfos (39).

Em cada condição, o sinal foi obtido como a intensidade do ThT a 482 nm do qual foi subtraído a intensidade obtida com a solução de ThT na ausência da proteína. Todos os dados foram processados utilizando o programa Origin.

Em todas as medidas a amostra protéica utilizada estava estocada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em alíquotas de 500 μL a 52,0 μM . Cada alíquota foi descongelada em gelo e centrifugada por 10 min. sob velocidade máxima a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ em centrífuga (Eppendorf 54804R). A solução estoque de ThT foi preparada a 10 mM em tampão A, em um volume de 1 mL e utilizada somente no dia em que foi preparada. Todas as medidas em função de um determinado parâmetro foram realizadas em um mesmo dia com a mesma alíquota de proteína. A intensidade do ThT foi medida imediatamente após a adição de 50 μM da solução desta sonda fluorescente à proteína. A amostra foi excitada a $\lambda = 450\text{ nm}$ e a fluorescência emitida medida a $\lambda = 482\text{ nm}$. Cada medida foi realizada com duração de 90 min., corrente de aproximadamente 18 Å e fendas de 2 mm (excitação e emissão).

3.4.1. Medidas de fluorescência em função da concentração protéica

As medidas em função da concentração protéica foram realizadas a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ nas seguintes concentrações do SEPT4-G: 26,0; 13,0; 6,5 e 3, 25 μM . Em um segundo experimento utilizou-se amostras nas mesmas concentrações incubadas a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. antes do início da medida.

3.4.2. Medidas de fluorescência em função da presença de diferentes metais

Medidas de fluorescência em função da presença de íons metálicos foram realizadas a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ com 13 μM de proteína e 2 mM de sal. As soluções estoques dos diferentes metais

utilizadas nestes experimentos são as mesmas descritas para os experimentos de dicroísmo circular.

3.4.3. Medidas de fluorescência em função da temperatura

As medidas foram realizadas nas temperaturas de 30, 37, 40, 45 °C com a proteína também a 13 µM. A medida controle do ThT em solução tampão foi realizada a 30°C durante 5 min. e a média da intensidade obtida foi posteriormente subtraída das medidas com solução protéica em cada temperatura.

3.4.4. Medidas de fluorescência em função do pH

As medidas em função do pH foram realizadas a 30 °C com um determinado tamponante a 25 mM e 5% de glicerol e concentração protéica de 4,5 µM .As soluções-tampão foram as mesmas utilizadas nos experimentos de dicroísmo circular.

3.5. Ensaio de cristalização

Os experimentos de cristalização do domínio SEPT4-G foram feitos com um extensivo número de soluções fatoriais entre elas as presentes nos kits Crystal Screen I e II, Screen PEG 6000 (Hampton Research) e Nextal PEG Suite através da técnica de difusão de vapor com gota suspensa. Gotas contendo 2 µL de proteína a 10 e a 5 mg/mL em tampão A foram misturadas a 2 µL da solução do reservatório e equilibradas contra 500 µL de solução no reservatório. Tais experimentos foram realizados a 18 e a 4 °C.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1. Expressão e Purificação do domínio SEPT4-G

As etapas do processo de expressão e purificação do domínio SEPT4-G podem ser verificadas através do gel de eletroforese (figura 4.1). Na figura 4.1 pode-se observar que a indução é bastante eficaz. A maior parte do produto recombinante está na fração solúvel (coluna 5), porém uma quantidade ainda significativa encontra-se na fração insolúvel. Após a purificação inicial na coluna de afinidade Ni-NTA ainda pode-se observar a presença de contaminantes que são eliminados na próxima etapa de purificação com a cromatografia de exclusão molecular (SEC) através da coluna Superdex-200.

Figura 4.1. Expressão e purificação do produto recombinante do SEPT4-G. **1.** Padrão de massa molecular. **2.** Cultura não-induzida **3.** Cultura induzida **4.** Fração insolúvel **5.** Fração solúvel. **6.** Lavagem da resina de afinidade com tampão acrescido de 10 mM de imidazol. **7.** Eluição da proteína de interesse com tampão acrescido de 100 mM imidazol. **8-10.** Domínio SEPT4-G após cromatografia de exclusão molecular.

Os resultados da SEC na Superdex-200 são mostrados na figura 4.2. A SEPT4-G aparece como um único pico simétrico dominante no perfil de eluição (pico1). O pico 1 corresponde ao domínio na forma dimérica. O perfil cromatográfico para o domínio SEPT4-G é coerente

com o que foi descrito para o domínio SEPT2-G no trabalho de Sirajuddin *et al.* (23) em que a forma dimérica é favorecida na presença do nucleotídeo.

Figura 4.2. Cromatografia de exclusão molecular do SEPT4-G (25 mM Tris-HCl, pH 7,8; 0,1 mM GDP; 10% glicerol; 100mM Imidazol) purificada na Superdex-200.

4.2. Análise da propensão em formar filamentos do SEPT4-G

É totalmente estabelecido que a formação de fibrilas amilóides tenha muitas características de um mecanismo de crescimento por nucleação. O curso da conversão de uma proteína para uma forma fibrilar em função do tempo (medido por emissão fluorescente do ThT, marcação com Congo Red, espalhamento de luz, ou através de outras técnicas), tipicamente inclui uma fase *lag* que é seguida por uma fase de crescimento exponencial rápida. Assume-se que a fase *lag* é o tempo necessário para a formação dos núcleos. Uma vez os núcleos formados, a fibrila cresce através de um processo rápido pela associação adicional tanto de monômeros ou oligômeros com os núcleos (41).

4.2.1. Efeito da concentração protéica na cinética de fibrilação

A fibrilação pode ser minimamente representada pelo esquema 1:

onde N, I, Nucl e F correspondem a conformação nativa, ao intermediário parcialmente desenovelado, ao núcleo fibrilar e a fibrila, respectivamente. Este modelo sugere que fatores de mudança de equilíbrio em favor do intermediário e/ou dos núcleos irão facilitar a formação das fibrilas. Desta forma, um aumento na concentração protéica, prediz um aumento na concentração do intermediário e conseqüentemente na taxa de fibrilação. A cinética de formação das fibrilas do domínio SEPT4-G foi monitorada usando a sonda ThT. Como mencionado anteriormente, o ThT sofre alterações espectrais características quando liga-se a uma variedade de fibrilas amilóides o que não ocorre quando este liga-se a precursores polipeptídicos, monômeros ou agregados amorfos (39).

O efeito da concentração na cinética de formação de fibrilas a 30 °C é ilustrado na figura 4.3. A figura 4.3 mostra que a uma dada concentração protéica as mudanças na intensidade do ThT seguem uma curva de característica tipo sigmoideal, com uma fase *lag* inicial, uma subseqüente fase de crescimento exponencial, e uma fase final de equilíbrio. Em tais medidas, um aumento na concentração protéica resulta em uma diminuição do t_{50} , onde t_{50} é o tempo referente a 50% da fluorescência máxima.

Para o SEPT4-G a fase *lag* é pouco perceptível o que pode ser explicado pelo fato do mecanismo de fibrilação deste domínio ser muito rápido quando comparado com experimentos similares realizados com outras proteínas. Para a α -sinucleína, por exemplo, a

curva atinge a fase final de equilíbrio após 100 horas em concentrações bem mais elevadas de proteína (41). No caso do SEPT4-G a fase de equilíbrio é atingida em menos de 90 min..

Figura 4.3. Emissão do ThT em 482 nm. Medidas realizadas em diferentes concentrações e 50 μM de ThT a 30 °C.

Em outro experimento, em que as amostras foram incubadas a 30 °C durante 30 min. antes do início da medida, é possível observar que o aumento do sinal de fluorescência na fase de equilíbrio é linear (figura 4.4).

Figura 4.4. Emissão do ThT em 482 nm. Amostras incubadas a 30 °C durante 30 min. antes do início da medida. Medidas realizadas com o SEPT4-G em diferentes concentrações e 50 μM de ThT a 30 °C.

4.2.2. Efeito de íons metálicos na formação de fibrilas

Considerando a co-localização de SEPT4 e α -sinucleína em núcleos de corpos de Lewis (LBs) presentes em doença de Parkinson (42) e a taxa de agregação metal-íon dependente verificada para α -sinucleína (41) é extremamente relevante investigar se íons metálicos também afetam a formação de agregados tipo amilóide descritos aqui. Assim, suas taxas de formação foram monitoradas na presença de cátions mono, di, e trivalentes.

Nas medidas de dicroísmo circular em função de diferentes metais a 16°C não foi verificada mudanças no espectro, indicando que a esta temperatura não há mudanças significantes na estrutura secundária da proteína (figura 4.5).

Figura 4.5. Espectro de dicroísmo circular (CD) do domínio recombinante SEPT4-G. Medidas realizadas com 4 μ M do SEPT4-G e 2 mM de sal a 16°C.

Figura 4.6. Emissão do ThT em 482 nm. Medidas realizadas com 13 μ M de SEPT4-G, 50 μ M de ThT e 2 mM de sal a 30°C.

A figura 4.6 mostra o processo de agregação a 30 °C para diferentes íons metálicos

Na presença de 2 mM de íons metálicos divalentes (Mg^{+2} , Ca^{+2}) a 30 °C o processo de agregação é significativamente mais rápido sendo o t_{50} aproximadamente três vezes menor que o controle. Em contraste, na presença de íons monovalentes (Na^+ , K^+) nesta mesma concentração e temperatura nenhuma variação no processo de agregação foi observada, indicando que estes cátions a esta concentração tem um efeito estimulatório mínimo.

Na presença de íons trivalentes (Al^{3+} e Fe^{3+}), por outro lado, o processo de agregação é extremamente rápido e provoca a precipitação quase que instantânea da amostra na forma de agregados amorfos, aos quais o ThT é incapaz de se ligar (dados não mostrados). Este comportamento é um tanto diferente do observado para α -sinucleína em que a formação de fibras é um processo muito mais lento do que o observado para a SEPT4 e a influência de metais di e trivalentes é bastante similar.

Para as medidas em função dos íons metálicos, a cinética monitorada pelo ThT mostra uma grande variação na magnitude no sinal de fluorescência, com a ausência de correlação entre a fase de crescimento exponencial e o sinal máximo alcançado no equilíbrio como observado nos experimentos em função da concentração protéica. Aparentemente, esse comportamento se deve a existência de dois processos de agregação, fibrilação *versus* a formação de agregados amorfos e/ou solúveis. Apenas as fibrilas exibem especificidade de ligação e aumento da fluorescência com o ThT. Assim, razões variáveis de fibrilas e agregados não-fibrilares indicam que há outra via, representada no esquema 2, em que diferentes cátions afetam as taxas relativas de formação de fibrilas ou de agregados não-fibrilares diferencialmente.

Esquema 2

Após a análise dos resultados acima é possível inferir que íons metálicos divalentes possam adicionar interações estabilizadoras entre os monômeros parcialmente desenovelados dentro da fibra em crescimento. Esta observação é pertinente com a formação de depósitos em doenças neurodegenerativas que têm sido freqüentemente relacionadas à exposição a íons metálicos. Estudos epidemiológicos indicam que este tipo de exposição consiste em um dos fatores de risco para doença de Parkinson (41).

4.2.3. Formação das fibrilas em função da temperatura

Nestes experimentos verificou-se que a velocidade de formação dos filamentos aumenta com a temperatura no caso de 30, 37 e 40 °C. Já a 45 °C pode-se observar uma rápida formação destas estruturas, porém a fase final de equilíbrio da intensidade do ThT foi bem menor quando comparado às demais medidas (figura 4.7).

Figura 4.7. Emissão do ThT em 482 nm. Medidas realizadas com 13 μ M do SEPT4-G, 50 μ M de ThT a 30 °C.

Tal resultado pode ser atribuído à presença do intermediário parcialmente enovelado no processo de formação dos filamentos. Este intermediário é alcançado com o aumento da temperatura, tornando o processo mais rápido, porém a 45°C as moléculas sofrem uma

mudança conformacional maior que a do intermediário, tornando impossível a formação de filamentos organizados e originando provavelmente agregados não-fibrilares.

4.2.4. Estabilidade estrutural e formação de fibrilas em função do pH

A análise da estabilidade estrutural em função do pH foi feita através de medidas de dicroísmo circular (figura 4.8). Através dos espectros de CD pode-se observar que nos pHs neutros (7,0 e 8,0) a proteína encontra-se estável, com dois mínimos em aproximadamente 222 nm e 210 nm, característicos de estruturas com grande conteúdo de hélices α . Já nos pHs ácidos (3,0 e 4,0) há um deslocamento do mínimo de 210 nm para 206 nm, tendendo a um perfil característico de estrutura com baixo conteúdo de estrutura secundária regular.

Figura 4.8. Espectros de dicroísmo circular (CD) do domínio recombinante SEPT4-G. Medidas realizadas com 6 μ M do SEPT4-G a 16°C.

Nas medidas de fluorescência em função do pH pode-se observar que em pHs neutros (7,0 e 8,0) há uma rápida ligação da sonda fluorescente ThT em função do tempo, evidenciando a formação de fibras tipo amilóide. Já nos pHs ácidos (3,0 e 4,0) não foi verificada a ligação da sonda na proteína (figura 4.9). Nestes pHs a proteína perde parte de

sua estrutura organizada, como indicado pelas análises de CD, não sendo capaz de formar estruturas fibrilares com caráter de amilóide às quais o ThT liga-se especificamente.

Figura 4.9. Emissão do ThT em 482 nm em função do pH. Medidas realizadas com 4.5 μ M do SEPT4-G, 50 μ M de ThT a 30 °C.

4.3. Ensaios de Cristalização do domínio SEPT4-G

Os experimentos de cristalização foram realizados a 18 e 4°C porém nenhum resultado promissor foi alcançado. A maioria das gotas apresentou um precipitado denso mesmo para uma concentração mais baixa de proteína. Algumas condições foram preparadas na ausência de sal, variando o pH e a porcentagem de diversos precipitantes visando diminuir a formação de agregados fibrilares ou não-fibrilares, já que na presença de sais foi observado um aumento significativo na taxa de formação dessas estruturas. Porém nenhuma destas tentativas resultaram em condições adequadas a cristalização desta macromolécula.

Capítulo 5

Conclusão e Perspectivas futuras

Estudos envolvendo septinas são sempre desafiadores e a quantidade de trabalhos recentes realizados para esta família de proteínas indica que ainda há muito que responder em relação a sua atuação tanto em processos celulares essenciais quanto em estados patológicos. Com os resultados e análises realizados durante este trabalho de mestrado foi possível compreender com mais detalhes a cinética de formação de agregados tipo amilóide do domínio SEPT4-G. Trabalhos adicionais são requeridos para elucidar o quanto a estrutura intermediária e a propensão a formar este tipo organizado de agregado têm relação com estados patológicos relacionados a doenças neurodegenerativas.

Experimentos de interação entre SEPT4 e α -sinucleína consistem em uma proposta bastante pertinente. Tais experimentos devem ser realizados quanto à propensão em formar filamentos e a estabilidade de ambas as proteínas em função de diversos parâmetros como aqueles utilizados nos experimentos descritos nesta dissertação. A proteína α -sinucleína tem um protocolo de expressão já estabelecido e este será realizado em nosso laboratório para os experimentos propostos acima.

Parte 2

Estrutura Cristalográfica da Glutathione -S-Transferase
de *Xylella fastidiosa*

Capítulo 6

Introdução

6.1. *Xylella fastidiosa* e Clorose Variegada dos Citros (CVC)

A *Xylella fastidiosa* é uma bactéria gram negativa, não flagelada que coloniza exclusivamente os vasos do xilema das plantas infectadas (43).

Dentro do grupo de bactérias patogênicas em plantas a *X. fastidiosa* é caracterizada como uma bactéria “limitada ao xilema” (XLB) e de difícil cultivo por procedimentos padrões de bacteriologia (44). O seu crescimento é lento em meio de cultura adequado, o qual rendeu-lhe a denominação “fastidiosa”.

A adesão da *X. fastidiosa* às paredes do xilema pode ser observada na figura 6.1.

Figura 6.1. Imagem de microscopia eletrônica mostrando *X. fastidiosa* aderidas às paredes do vaso xilema de *Citrus*. (Modificado de <http://aeg.lbi.ic.unicamp.br>)

Esta bactéria é responsável por várias doenças em plantas economicamente importantes, incluindo a Clorose Variegada dos Citros (CVC) ou Amarelinho. Em todos os

casos, este organismo infecta o xilema da planta comprometendo a produção do fruto. A figura 6.2 mostra frutos sadios ao lado de frutos de tamanho reduzido devido à CVC.

O ciclo de disseminação da bactéria nas plantas é realizado através de insetos vetores, que ao se alimentarem do xilema das plantas contaminadas adquirem a bactéria. Dentro do intestino do inseto, as bactérias se reproduzem e esse inseto infectado passa a disseminar a doença para plantas sadias através do aparelho picador-sugador durante sua alimentação (45,46).

A CVC é considerada uma das doenças mais devastadoras dos citrus e foi primeiramente relatada em 1987, nos Estados de São Paulo e Minas Gerais (47). A partir desta data a doença se espalhou rapidamente em todas as regiões citricultoras paulistas através da técnica do enxerto com ramos contaminados e por insetos vetores, tornando-se largamente distribuída.

Figura 6.2. Comparação de frutos normais com frutos afetados pela CVC: frutos sadios ao lado de frutos de tamanho reduzido devido à doença. (Figura adaptada de <http://www.fundecitrus.com.br>)

Esta doença gera grandes prejuízos, principalmente no estado de São Paulo, que é o maior exportador de suco de laranja do mundo, sendo responsável por aproximadamente 90% da produção nacional e 30% da mundial. No Brasil, a CVC causa perdas anuais de aproximadamente 100 milhões de dólares para indústria cítrica (48).

Devido a sua relevância na citricultura nacional, um consórcio de laboratórios do Estado de São Paulo financiado pela FAPESP (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de

São Paulo) sequenciou todo o genoma da cepa 9a5c deste organismo, constatando um total de 2.905 genes, sendo a metade destes similares a proteínas de funções conhecidas (49). O conhecimento da sequência completa do genoma da *X. fastidiosa* representou um grande passo para a compreensão das características metabólicas e replicativas, e para o entendimento dos mecanismos de patogenicidade. Alguns trabalhos publicados têm explorado as informações geradas pelo sequenciamento genômico, destacando uma série de hipóteses para o funcionamento do metabolismo energético, transporte de nutrientes, adesão, agregação, toxicidade, secreção de fatores de patogenicidade, interações intercelulares, homeostase de ferro, resposta antioxidante e outros mecanismos importantes para a patogenicidade. (43,49-54).

As funções atribuídas aos genes sequenciados durante a notação no Projeto Genoma da *X. fastidiosa* foram baseadas apenas por similaridade sequencial com genes que codificam proteínas de funções conhecidas de outros organismos (49). Portanto a elucidação de estruturas tridimensionais de proteínas codificadas por esses genes é essencial para melhor compreendermos o mecanismo de ação deste patógeno.

O gene *gst* foi um dos genes identificados pela técnica de microarranjos de DNA como sendo relacionado à patogenicidade da bactéria *X. fastidiosa* no seu hospedeiro. A ORF XF1210 de *X. fastidiosa* que codifica a enzima Glutathione-S-transferase (GST) com 205 aminoácidos (22,7 kDa) foi escolhida para este estudo baseada em sua função específica no metabolismo biodegradativo, desintoxicação e excreção de substratos xenobióticos (55).

6.2 Glutathione-S-transferases (GSTs)

Glutathione-S-Transferases (GSTs) formam um grupo de isoenzimas multifuncionais que catalisam a conjugação dependente de glutathione (GSH) e reações de redução envolvidas

na desintoxicação de compostos xenobióticos e endobióticos. GSTs são as principais enzimas de desintoxicação encontradas no espaço intracelular e, principalmente no citosol, de procariotos a mamíferos. (56)

A ampla e complexa superfamília de GSTs tem sido subdividida em um crescente número de classes baseadas em vários critérios como seqüência de nucleotídeos/ aminoácidos, estrutura terciária/quaternária, especificidade pelo substrato e propriedades imunológicas e cinéticas. Estruturas cristalográficas são disponíveis para a maioria das classes e, apesar da limitada identidade seqüencial total, estas seguem um enovelamento similar com diferenças estruturais concentradas especialmente em torno do sítio ativo e da interface entre as subunidades (56). Genes e proteínas de mamíferos (particularmente ratos, camundongos e humanos) têm sido bem caracterizados, porém estudos de GSTs de não-mamíferos têm revelado a existência de várias novas classes e assim estendido nosso conhecimento em relação à diversidade estrutural e funcional destas proteínas (56).

GSTs citosólicas existem como dímeros compostos de subunidade de aproximadamente 25 kDa. Cada subunidade é dividida em dois domínios: um domínio N-terminal que adota a topologia α/β e o domínio C-terminal composto inteiramente por hélices α . O sítio ativo das GSTs citosólicas consiste em dois subsítios de ligação: o subsítio G onde se liga a GSH e o subsítio H em que eletrófilos hidrofóbicos se ligam (57).

Estas enzimas são agrupadas dentro de pelo menos oito classes distintas - alpha, kappa, mu, Omega, pi, sigma, theta e zeta. Geralmente a identidade seqüencial intraclasses é maior que 70% enquanto a identidade interclasses é usualmente menor que 30%. (57) Beta, Delta, Epsilon, U, Lambda, Phi, and Tau constituem classes propostas recentemente para GSTs isoladas e caracterizadas de bactérias (β), insetos (δ , ϵ , U) e plantas (λ , ϕ , e τ) (58).

GSTs têm sido descritas em uma variedade de bactérias, espécies de *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Burkholderia* e *Rhodococcus*. Em

adição à função de conjugar GSH na resistência a antibióticos, essas enzimas também são capazes de ligar-se a antibióticos. A determinação da estrutura tridimensional da bem caracterizada enzima de *Proteus mirabilis* revelou uma ligação dissulfeto entre um resíduo de cisteína e o grupo tiol de GSH que é similar ao observado na classe Omega de mamíferos. Análises de sequência sugerem que um número de outras GSTs bacterianas compartilha desta cisteína que levou a designação de uma nova classe de GST, Beta (de bactéria). Muitos dos membros desta nova classe eram anteriormente incluídos na classe Theta. (56)

Ainda há muitas questões envolvendo a classificação de GSTs bacterianas em uma única classe. Como mencionado anteriormente, sabe-se muito pouco sobre as GSTs de não-mamíferos e estudos estruturais e funcionais de tais enzimas são de grande relevância.

Capítulo 7

Objetivos

O gene *gst* foi um dos genes identificados pela técnica de microarranjos de DNA como sendo relacionado à patogenicidade da bactéria *X. fastidiosa* no seu hospedeiro. Portanto a elucidação da estrutura tridimensional da enzima codificada por esse gene é essencial para compreendermos o mecanismo de ação deste patógeno, bem como para a busca de drogas capazes de inativar tal enzima. Assim os objetivos propostos aqui foram:

- i) Realizar ensaios de cristalização para obtenção de cristais da Glutathione S-Transferase de *X. fastidiosa* (XfGST) ;
- ii) Realizar a coleta de dados de difração de raios X;
- iii) Resolução da estrutura cristalográfica desta enzima seguida de análise e comparação estrutural.

Capítulo 8

Metodologia

A proteína XfGST foi obtida a partir de métodos de clonagem, expressão e purificação pela Dra. Regiane de F. Travensolo pertencente do Instituto de Química de São Carlos – Laboratório de Cromatografia. Tais procedimentos estão descritos no trabalho Travensolo et al., 2008 (59).

8.1. Cristalização de macromoléculas

Para promover a cristalização, as moléculas protéicas têm de ser trazidas a um estado de supersaturação, termodinamicamente instável, no qual pode se desenvolver numa fase amorfa ou cristalina quando este retornar ao equilíbrio. Supersaturação pode ser alcançada pela evaporação lenta do solvente ou pela variação de alguns dos parâmetros como temperatura, pH e força iônica. Neste processo a entropia diminui, ocorre a formação de ligações novas e mais estáveis, as interações atrativas aumentam e as repulsivas diminuem (60).

Existem muitas técnicas para a cristalização de macromoléculas biológicas. As técnicas mais utilizadas são diálise e difusão de vapor. Esta última apresenta três variações quanto à posição da gota; gotas suspensas (*hanging drops*), gotas sentadas (*sitting drops*) e gotas sanduíches (*sandwich drops*).

Neste trabalho os ensaios de cristalização foram realizados através da técnica difusão de vapor em gotas suspensas que está representada na figura 8.1. O princípio desta técnica é o processo de equilíbrio entre duas soluções através da fase de vapor num meio fechado. Uma gota de solução da proteína a ser cristalizada contendo uma baixa concentração do agente precipitante é equilibrada contra um volume muito maior de solução com uma concentração bem mais alta do agente precipitante. Assim, devido à diferença entre os potenciais químicos, a solução menos concentrada perde água em uma tentativa de que a concentração de precipitante das duas soluções se iguale. À medida que a gota perde água, a concentração de proteína também aumenta lentamente até atingir a região de nucleação. A partir da formação de um núcleo, este irá crescer lentamente dando origem a um cristal (60).

Figura 8.1. Representação do experimento de cristalização por difusão de vapor em gotas suspensas. A gota contendo a proteína em solução apresenta igual composição ao reservatório do poço, porém, com metade da concentração. Dessa forma, a gota tende a perder solvente lentamente, até que as concentrações da gota e do poço adquiriram uma condição de equilíbrio.

Os experimentos iniciais de cristalização da XfGST foram feitos a 18 °C utilizando as soluções fatoriais Crystal Screen I, II e Screen PEG 6000 (Hampton Research) através da técnica difusão de vapor com gota suspensa. Gotas contendo 2 µL de proteína a 7 mg/mL em tampão Tris-HCl pH 8,0; 20mM NaCl e 5% de glicerol foram misturadas a 2 µL da solução do reservatório e equilibradas contra 500 µL de solução no reservatório.

8.2. Coleta e processamento dos dados de difração de raios X

As macromoléculas biológicas podem formar um arranjo cristalino, ou seja, um retículo altamente regular e periódico, com unidades fundamentais idênticas – as celas unitárias. Sendo assim, após a cristalização da macromolécula, o próximo passo é expor o cristal ao feixe de raios X.

Após a otimização das condições de cristalização para a XfGST, um monocristal foi selecionado utilizando um *loop* de nylon (Hampton Research) e transferido da gota de cristalização para 5 μ L de uma solução criogênica contendo 5% de etileno glicol; 28% de PEG 6000 e 100 mM Hepes pH 7.6 por alguns segundos. O cristal foi então rapidamente congelado em nitrogênio líquido a 100K para evitar danos causados pela radiação e exposto ao feixe de raios X para a coleta de dados. O conjunto de dados de difração foi coletado através de um detector (placa de imagem) Mar345dtb acoplado ao gerador de anodo rotatório Rigaku Ultra X18, equipado com anodo de cobre e espelho de focalização Blue Confocal. A radiação utilizada foi a da linha Cu-K α correspondente a um comprimento de onda $\lambda=1,54184$ Å. Um total de 200 imagens foi coletado com a distância cristal ao detector de 170,0 mm utilizando o método de oscilação com o intervalo de 1° por imagem. Os dados foram processados com o programa *MOSFLM* (61) e escalonados e promediados com *SCALA* (62) e as amplitudes foram estimadas utilizando *TRUNCATE* (63).

8.3. Substituição Molecular

Num experimento típico de difração de raios X medimos as intensidades nos feixes espalhados. A informação sobre a fase é perdida no experimento. Para resolvermos uma estrutura a partir de dados de difração de raios X precisamos da informação da intensidade e da fase. Um dos métodos de resolução do problema de fase é a Substituição Molecular, o qual foi utilizado no caso da *Xf*GST. Neste método utiliza-se uma estrutura de proteína com identidade seqüencial significativa quando comparada com a estrutura que se busca resolver. Neste método o modelo de busca é rotacionado e transladado na cela unitária da estrutura desconhecida, e as amplitudes de difração calculadas para cada orientação/translação são comparadas com as observadas. Quando há similaridade expressiva, usa-se o modelo conhecido para o cálculo de fases, as quais, combinadas com as amplitudes observadas, produzem os mapas de densidade eletrônica que permitem a resolução da estrutura.

A substituição molecular foi realizada utilizando como modelo de busca a estrutura cristalográfica da Glutathione-S-transferase de *Burkholderia xenovorans* (código PDB: 2DSA, 37% de identidade na seqüência de aminoácidos quando comparada com *X.fastidiosa*). Os cálculos foram realizados utilizando-se o programa Phaser (64).

8.4. Refinamento Cristalográfico

Devido a baixa identidade seqüencial entre a *Xf*GST e a estrutura utilizada como modelo de busca para a substituição molecular (37%) utilizou-se o Programa de reconstrução Autobuild Wizard do pacote PHENIX (65) que promove a alteração dos resíduos de acordo com a seqüência da estrutura a ser refinada.

Os ciclos de refinamento foram feitos através do programa *phenix.refine* alternando-se com a inspeção visual e manipulação do modelo no programa Coot (66) .

O Refinamento cristalográfico foi realizado utilizando-se os seguintes métodos: faixa de resolução mínima de 30,0 Å e máxima de 2,25 Å, priorizando-se a informação das fases; simetria não-cristalográfica (NCS); método de dinâmica molecular com *Simulated Annealing*; foi incluído refinamento TLS através do qual as amplitudes e coordenadas vibracionais foram separadas por grupos de átomos em uma matriz. A estrutura cristalina da XjGST contém 6 monômeros na cela unitária e a cada um foram atribuídos os mesmos grupos de átomos para o refinamento TLS. A avaliação estereoquímica do modelo foi realizada com o auxílio do programa PROCHECK (67).

8.5. Análises Seqüenciais e Estruturais

Os alinhamentos seqüenciais realizados neste trabalho foram feitos com os Programas ClustalX (68). Os alinhamentos estruturais foram gerados através dos programas MUSCLE (69) e Theseus (70).

As figuras geradas de estruturas tridimensionais foram feitas com o programa Pymol (71). Também foram utilizados os programas TexShade (72) e CdPlot (73).

Capítulo 9

Resultados e Discussão

9.1. Cristalização e processamento dos dados de difração de raios X

Pequenos cristais da proteína XjGST foram obtidos, depois de 10 dias, em várias condições presentes no Screen PEG 6000. Tais condições foram otimizadas em relação à concentração de PEG 6000 e ao pH. Os melhores cristais foram obtidos na condição contendo 28% de PEG 6000 e 100 mM Hepes pH 7,6 (figura 9.1).

Figura 9.1. Cristal da XjGST recombinante obtido através da técnica de difusão de vapor em gotas suspensas com 100 mM Hepes pH 7.6, 28%(w/v) PEG 6000 como precipitante. Dimensão típica de 0,2x 0,2x 0,2 mm.

Os cristais de XjGST pertencem ao sistema triclinico e o grupo espacial foi identificado como P_1 . Com o peso molecular do monômero de 22.688 Da e assumindo seis moléculas na unidade assimétrica, obtêm-se o coeficiente de Matthews (74) V_M de $2,33 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$, que corresponde a um conteúdo de solvente de 47,3%. Dados de difração foram coletados até um limite máximo de resolução de $2.23 \text{ \AA}$. As estatísticas do processamento de dados estão resumidas na tabela 9.1.

Tabela 9.1 - Parâmetros do cristal e estatísticas do processamento de dados. Os valores em parênteses correspondem à camada de mais alta resolução.

Grupo espacial	P1
Parâmetros de Cella (Å, °)	a = 47,73; b = 87,73; c = 90,74 $\alpha=63,45$ $\beta = 80,66$ $\gamma= 94,55$
Limite de resolução (Å)	30,01-2,23 (2,35-2,23)
Número total de imagens	200
Mosaicidade (°)	1,07
Número Total de reflexões	117272 (15922)
Número de reflexões únicas	57152 (8104)
Multiplicidade	2,1 (2,0)
R_{merge} (%)	9,0 (37,2)
$I/\sigma(I)$	8,3 (1,9)
Completeza (%)	93,5 (89,4)

Figura 9.2 Padrão de difração típico do cristal de X/GST para 1° de oscilação para cada exposição. A borda do detector corresponde à resolução de 2,00 Å.

9.2. Substituição Molecular

As simulações realizadas pelo programa Phaser convergiram claramente para uma solução com seis moléculas na unidade assimétrica com um Z score de 15,57 na função de translação depois da inclusão da última molécula.

As moléculas estão arranjadas como três dímeros na cela unitária, em acordo com a organização dimérica conhecida para GSTs citosólicas em solução.

9.3. Refinamento Cristalográfico

Foram utilizadas 54296 reflexões para o cálculo do R_{factor} e 2856 foram separadas para o cálculo do R_{free} , tais reflexões consistem em 5% do conjunto total. A faixa de resolução utilizada foi de 30,0 a 2,25 Å.

As moléculas de água foram introduzidas e checadas em relação à autenticidade pelos valores de fator B e também através da análise dos mapas de densidade eletrônica.

Ao final do refinamento os valores de R_{factor} e R_{free} convergiram para 19,6% e 22,7% respectivamente. O refinamento foi dado como encerrado quando não foi mais possível melhorar os valores dos índices de discrepância.

O modelo é constituído por seis moléculas de proteína na unidade assimétrica (com um total de 1230 resíduos), seis moléculas de glutathione (GSH), 1 em cada monômero e 592 moléculas de água.

Os valores finais para os desvios médios quadráticos (R.m.s.d.) para comprimentos e ângulos de ligações interatômicas da estrutura foram de 0,005 Å e 0,939°, respectivamente. O parâmetro de vibração atômica total foi de 31,20 Å². A análise do diagrama de Ramachandran gerado pelo programa PROCHECK, mostra que 90,5% resíduos encontram-se nas regiões mais favoráveis, 8,3% estão nas regiões adicionais permitidas, resíduos 0,7% em regiões generosamente permitidas. Tais estatísticas estão sumarizadas na tabela 9.2.

Tabela 9.2 - Estatísticas do refinamento do modelo da XfGST

Número total de reflexões	57152
Número total de reflexões (R_{free})	2856
Intervalo de resolução (Å)	30,6 – 2,25
Completeza (%)	93,9
$R_{\text{factor}}/R_{\text{free}}$ (%)	19,6 / 22,7
R.m.s.d. dos valores ideais:	
comprimento das ligações (Å)	0,005
ângulos das ligações (°)	0,939
Parâmetro de vibração atômica total (Å ²)	31,20
Diagrama de Ramachandran	
mais favoráveis (%)	90,5
permitidas (%)	8,3
generosamente permitida (%)	0,7

9.4. Análises Sequenciais e Estruturais

9.4.1. Ligante GSH e suas interações no subsítio G da XfGST

Foi encontrada uma densidade eletrônica bem definida na posição da molécula do GSH nos subsítios G de cada monômero e estes ligantes foram modelados com ocupação 1. Já no subsítio H nenhuma densidade compatível com o ligante foi observada. As moléculas de GSH não foram adicionadas a solução contendo a proteína XfGST em nenhuma etapa do processo de expressão, purificação ou ensaios de cristalização. É possível inferir que moléculas do ligante existentes nas células de *E. coli* puderam formar o complexo com a enzima. A figura 9.3 evidencia resíduos que interagem com o GSH no subsítio G da XfGST. Esta interação é composta de 14 ligações polares e 6 ligações apolares.

Uma pequena porção do sítio ativo é formada por resíduos derivados da outra molécula do dímero (Ser 100 e Asp 101). As ligações formadas por estes resíduos e o N1 do GSH confirma a importância do estado dimérico observado para GSTs em solução.

Figura 9.3. Resíduos que interagem com a glutationa (GSH) presente no subsítio G da enzima X/GST. Os resíduos indicados com linha (') pertencem à outra molécula do dímero.

A classe beta é caracterizada pela presença de uma Cys no subsítio G. Esta Cys é covalentemente ligada a GSH na estrutura da GST de *Proteus mirabilis* (PmGST B1-1) (códigos PDB: 1PMT e 2PMT) [57]. Porém nas estruturas da GST de *Burkholderia xenovorans* (códigos PDB: 2DSA e 1GDR) esta ligação covalente não é observada.

Para a XfGST, a ligação entre os enxofres da Cys 10 e do GSH apresenta a distância de 3,19 Å e os rotâmeros observados não são os ideais para a formação de uma ligação dissulfeto.

9.4.1. Análise seqüencial e estrutural das GSTs bacterianas

Na literatura é recorrente a afirmação de que apesar da baixa identidade seqüencial, todas as GSTs compartilham um enovelamento tridimensional conservado e que as diferenças concentram-se especialmente em torno do sítio ativo e da interface entre as unidades que compõe o dímero [55,57]. Desta forma, uma análise seqüencial e estrutural foi realizada com as GSTs bacterianas disponíveis no PDB tendo como referência a XfGST.

O alinhamento seqüencial gerado para 7 GSTs bacterianas identificadas por seus códigos PDB juntamente com a XfGST pode ser observado na figura 9.4. Nesta figura os resíduos presentes na interface entre as moléculas do dímero estão destacados em verde.

Podemos observar que a maioria dos resíduos conservados consiste em um núcleo hidrofóbico predominantemente no domínio N-terminal.

Figura 9.4. Alinhamento estrutural gerado pelo programa TexShade. O grau de conservação é dado em um gradiente do preto ao cinza. Os resíduos que participam da interface entre as moléculas do dímero estão destacadas em verde e os resíduos de interação com GSH estão identificados pelos símbolos (●,*). A estrutura secundária para a *XfGST* é representada na parte superior do alinhamento.

É razoável assumir que proteínas que interagem com o mesmo ligante tenham sítios com certo grau de conservação. Através destes alinhamentos verificou-se que os resíduos de interação com a ligante GSH apresentam uma baixa conservação, o que consiste em um dado interessante visto que há uma variabilidade considerável para a ligação da mesma molécula.

A figura 9.5 mostra a sobreposição das cadeias principais e dos ligantes presentes nas estruturas cristalográficas. A inserção de 8 resíduos (111-118) observada na sequência da *XfGST* é evidente como um *loop* adicional e dois destes resíduos fazem parte da interface entre as moléculas do dímero (Tyr 115 e Leu 116).

Figura 9.5. Sobreposição das cadeias principais e dos ligantes presentes nas estruturas cristalográficas das GSTs bacterianas analisadas. **A.** vista frontal. **B.** vista lateral e **C.** vista lateral evidenciando um *loop* adicional existente na xfGST (cadeia representada em laranja).

As superfícies de potencial eletrostático das enzimas analisadas podem ser vistas na figura 9.6.

Figura 9.6. Comparação dos mapas de distribuição de cargas para as GSTs bacterianas analisadas. A superfície molecular está colorida de acordo com sua superfície de potencial eletrostático (do vermelho (-) ao azul (+)).

Esta representação mostra que tais enzimas variam consideravelmente também em relação à distribuição de cargas na superfície. Estes dados podem ser explorados e interpretados juntamente com dados funcionais, levando-se em conta os ligantes presentes em cada uma das estruturas. Os mecanismos de ação propostos para as GSTs destes organismos também devem ser considerados para interpretações consistentes.

Há muitos aspectos que podem ser analisados quanto à variabilidade das GSTs bacterianas e tais análises são bastante válidas visto que há poucos estudos sobre GSTs de não-mamíferos. A análise descrita aqui consiste em estudos preliminares que indica os aspectos estruturais que podem ser futuramente abordados.

Capítulo 10

Conclusão e Perspectivas futuras

A estrutura cristalográfica da enzima Glutathione-S-transferase da *X. fastidiosa* foi resolvida pelo método de substituição molecular e refinada até um modelo com valores de R_{factor} , R_{free} e avaliação estereoquímica que indicam a confiabilidade do modelo. Tal estrutura cristalográfica terá suas coordenadas atômicas depositadas no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB).

A análise estrutural da *XfGST* e da família desta enzima mostrou-se bastante interessante. Assim, vários experimentos podem ser propostos para dar continuidade a este estudo.

O trabalho de Travensolo, et al., 2008 mostra que a atividade enzimática específica calculada para a *XfGST* é bem mais alta do que a verificada para outras GSTs bacterianas (59). A atividade enzimática foi monitorada através da formação do conjugado CDNB-GSH, sendo CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) um substrato padrão para ensaios enzimáticos realizados para GSTs. A atividade enzimática específica foi calculada pela quantidade de enzima que catalisou a formação de 1 μMol do conjugado CDNB-GSH ($\epsilon_{340} = 9.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A atividade enzimática específica observada para *XfGST* foi de 3.3 U mg^{-1} enquanto que para GSTs de outras bactérias como a GST de *P. mirabilis* e a de *E. coli* a atividade enzimática específica é de 1.1 U mg^{-1} e de $2,5 \times 10^{-3} \text{ U mg}^{-1}$, respectivamente.

A obtenção de cristais da *XfGST* complexada com diferentes substratos e GSH; e a posterior resolução dos modelos cristalográficos para estes complexos podem elucidar várias

questões referentes aos subsítios G e H, como a afinidade do co-fator e do substratos. Ensaaios enzimáticos adicionais também serão realizados.

Capítulo 11

Considerações Finais

A possibilidade de me comprometer com dois projetos abordando problemas biológicos distintos, ambos com reconhecida relevância, foi um desafio que resultou em um grande ganho científico pela oportunidade de trabalhar com diversas técnicas e abordagens.

O período para a realização de um trabalho de mestrado é bastante curto para responder as questões inseridas em sistemas biológicos complexos como aqueles relacionados à septinas e a GST de *X. fastidiosa*, mas apesar disto foi possível contribuir de alguma forma para o entendimento destes sistemas.

As dificuldades experimentais diárias e as discussões e questionamentos científicos resultantes deste trabalho de mestrado foram fundamentais para minha formação e certamente darão embasamento para os próximos desafios na área da pesquisa.

Referências

- 1 HALL, P. A. & RUSSELL, S. E. The pathobiology of the septin gene family. *The Journal of Pathology*, v. 204, n. 4, p.489–505, 2004.
- 2 FRAZIER, J. A. et al. Polymerization of purified yeast septins: evidence that organized filament arrays may not be required for septin function. *The Journal of Cell Biology*, v. 143, n. 3, p. 737–749, 1998.
- 3 HATWELL, L. H. Genetic control of the cell division cycle in yeast IV. genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Experimental cell research*, v. 69, p.265-276, 1971.
- 4 WEIRICH, C. S.; ERZBERGER, J. P.; BARRAL, Y. The septin family:of GTPases: architecture and dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v.9, n.6, p. 478-489, 2008.
- 5 DREES, B. L.; SUNDIN, B.; BRAZEAU, E. A protein interaction map for cell polarity development. *The Journal of Cell Biology*, v. 154, n. 3, p. 549-571, 2001.
- 6 FATY, M.; FINK, M.; BARRAL, Y. Septins: a ring to part mother and daughter. *Current Genetics*, v. 41, n. 3, p. 123-131, 2002.
- 7 IRAZOQUI, J. E. & LEW, D. J. Polarity establishment in yeast. *Journal of Cell Science*, v. 117, n. 11, p.2169-2171, 2004.
- 8 DE MARINI, D. J.; ADAMS, A. E.; FARES, H. A septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *The Journal of Cell Biology*, v. 139, n. 1, p. 75-93, 1997.
- 9 HSU, S.C. et al. Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments. *Neuron*, v. 20, n. 6, p. 1111-1122, 1998.
- 10 BEITES, C. L. et al. The septin Cdc12-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis *Nature Neuroscience*, v.2, n. 5, p. 434-439, 1999.
- 11 SURKA, M. C.; TSANG, C. W.; TRIMBLE, W. S. The mammalian septin MSF localizes with microtubules and is required for completion of cytokinesis *Molecular Biology of the Cell*, v.13, n. 10, p. 3532-3545, 2002.
- 12 FINGER, F. P.; KOPISEK, K. R.; WHITE, J. G. A role for septins in cellular and axonal migration in *C. elegans*. *Developmental Biology* v. 261, n. 1, p. 220-234, 2003.
- 13 NAGATA, K. I. et al. Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in mammary HMEC cells depends on interactions with microtubules. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 20, p. 18538-18543, 2003.

- 14 LARISCH S. et al. A novel mitochondrial septinlike protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif. *Nature Cell Biology*, v.2, n. 12, p. 915–921, 2000.
- 15 MACARA, I. G. et al. Mammalian septins nomenclature. *Molecular Biology of the Cell*, v. 13, n. 12, p. 4111–4113, 2002.
- 16 LEIPE, D. D. et al. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *Journal of Molecular Biology*, v.317, n. 1, p. 41–72, 2002.
- 17 SARASTE, M.; SIBBALD, P.R.; WITTINGHOFER, A. The P-loop — a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 15, n. 11, p. 430–434, 1990.
- 18 BOURNE, H.R.; SANDERS, D.A.; MCCORMICK, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, v.349, n. 6305, p. 117–127, 1991.
- 19 KARTMANN, B. & ROTH, D. Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis. *Journal of Cell Science*, v.114, n. 05, p. 839–844, 2001.
- 20 MARTINEZ, C. et al. Human septin-septin interactions as a prerequisite for targeting septincomplexes in the cytosol. *The Biochemical Journal*, v. 382, n. 3, p. 783–791, 2004.
- 21 FIELD, C. M. et al. A purified *drosophila* septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity. *Journal of Cell Biology*, v. 133, n. 3, p. 605–616, 1996.
- 22 KINOSHITA, M. et al. Self-and actin-templated assembly of Mammalian septins. *Developmental Cell*, v.3, n.6, p. 791–802, 2002.
- 23 SIRAJUDDIN, M. et al. Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature* v. 449, n.7160, p. 311–315, 2007
- 24 XIE H. et al. Characterization of the mammalian septin H5: distinct patterns of cytoskeletal and membrane association from other septin proteins. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, v.43, n.1, p. 52–62, 1999.
- 25 TANAKA, M. et al. Characterization of Tissue- and Cell-Type-specific Expression of a Novel Human Septin Family Gene, Bradeion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* v. 286, n. 3, p. 547–553, 2001.
- 26 TANAKA, T. et al. 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*, v. 9, n. 6, p. 483–488, 2002.
- 27 KINOSHITA A. et al Identification of septins in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology*, v. 153, n. 5, p. 1551–1560, 1998.
- 28 IHARA, M. et al. Association of the cytoskeletal GTP-binding protein Sept/H5 with cytoplasmic inclusions found in Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 26, p. 24095–24102, 2003.

- 29 CHITI, F.; DOBSON, C. M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual Review of Biochemistry*, v. 75, p. 333–366, 2006.
- 30 WESTERMARK, P. et al. Amyloid: toward terminology clarification. report from the nomenclature committee of the international society of amyloidosis. *Amyloid*, v. 12, n.1 p. 1–4, 2005.
- 31 SUNDE, M.; BLAKE, C. The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Advances in Protein Chemistry*, v. 50, p.123–159, 1997.
- 32 GARCIA, W. et al. An intermediate structure in the thermal unfolding of the GTPase domain of human septin 4 (SEPT4/Bradeion-beta) forms amyloid-like filaments in vitro. *Biochemistry*, v. 46, n. 39, p.11101-11109, 2007.
- 33 LEVINE, H. III Thioflavin T interaction with Alzheimer's disease β -amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Science*, v. 2, n. 3, p. 404–410, 1993.
- 34 KREBS, M. R. H.; BROMLEY, E. H. C.; DONALD, A. M. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localization and implications *Journal of Structural Biology* v.149, n. 1 p.30–37, 2005
- 35 GARCIA, W. et al. Dissection of a human septin: definition and characterization of distinct domains within human SEPT4. *Biochemistry*, v. 45, n.46, p. 13918-13931, 2006.
- 36 LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-685, 1970.
- 37 GILL, S. C.; VON HIPPEL, P. H. Calculation of proteins extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry*, v. 182, n. 2, p. 319-326, 1989.
- 38 ALDER, A. J.; GREENFIELD, N. J.; FASMAN G. D. Circular dichroism and optical rotary dispersion of proteins and polypeptides. *Methods in Enzymology*, v. 27, p. 675, 1973.
- 39 LEVINE H. III Quantification of β -sheet amyloid fibril structures with Thioflavin T. *Methods in Enzymology*, v. 309, p. 274-284, 1999.
- 40 NAIKI, H. et al. Establishment of a kinetic model of dialysis-related amyloid fibril extension in vitro. *Amyloid*, v. 4, p. 223-232, 1997.
- 41 UVERSKY, V. N.; LI, J.; FINK, A. L. Metal-triggered structural transformations, Aggregation, and Fibrillation of Human α -Synuclein. *Journal of Biological Chemistry* v. 276, n. 47, p.44284-44296, 2001.
- 42 IHARA, M. et al. Sept4, a component of presynaptic scaffold and Lewy bodies, is required for the suppression of α -synuclein neurotoxicity. *Neuron*, v. 53, n. 4, p. 519–533, 2007.
- 43 LAMBAIS, M. R. et al. A genomic approach to the understanding of *Xylella fastidiosa* pathogenicity. *Current Opinion in Microbiology*, v. 3, n. 5, p. 459-462, 2000.

- 44 PURCEL, A. H.; HOPKINS, D. L. Fastidious Xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, v. 34, p. 131-151, 1996.
- 45 BRLANSKY, R. H. et al. Colonization of the sharpshooter vector, *oncometopia nigricans* and *homalodisca coagulata*, by xylem-limited bacteria. *Phytopathology*, v.73, p.530-535, 1983
- 46 ROBERTO, S. R. et al. Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia facialis* em citros. *Fitopatologia Brasileira*, v.21, p. 517, 1996
- 47 ROSSETTI, V. M. et al. Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. *C. R. Acad. Sci. Paris série III* v. 310, p. 345-349, 1990.
- 48 SOUZA, A. A. et al. Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 16, n. 10, p. 867-875, 2003.
- 49 SIMPSON, A. J. G. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*, v. 406, n. 6792, p. 151–159, 2000.
- 50 KEEN, N. T. From rags to riches: insights from the first genomic sequence of a plant pathogenic bacterium. *Genome Biology*. v.1, n. 3, p.10191–10194, 2000.
- 51 DOW, J. M. e DANIELS, M. J. *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plant, *Yeast* v.17, n. 04, p. 263–271, 2000.
- 52 SILVA, F. R. Fastidium gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. *FEMS Microbiology Letters*, v.203, n. 2 p. 165–171, 2001.
- 53 LEITE, B. Genomic and X-ray microanalysis indicate that Ca^{2+} and thiols mediate the aggregation and adhesion of *Xylella fastidiosa*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.35, n. 6, p. 645–650, 2002.
- 54 MEIDANIS, J.; BRAGA, M. D. V.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Whole-genome analysis of transporters in the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 66, n. 2, p. 272–299, 2002.
- 55 TRAVENSOLO, R. F. Análise da expressão gênica de *Xylella fastidiosa* por microarranjos de DNA Tese (doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) Universidade Estadual Paulista/UNESP de Jaboticabal, Jaboticabal – SP, p 1-117, 2004
- 56 SHEEHAN, D. et al. Structure, function and evolution of glutathione transferase: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *The Biochemical Journal*, v. 360, n. 1, p. 1–16, 2001.
- 57 ROSSJOHN, J. et al. A mixed disulfide bond in bacterial glutathione transferase: functional and evolutionary implications. *Structure*, v.6, n. 6 p. 721–734, 1998.

- 58 HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione-transferases *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 45, p. 51–88, 2004.
- 59 TRAVENSOLO, R. F. et al. Cloning, expression, purification and characterization of recombinant glutathione-S-transferase from *Xylella fastidiosa* *Protein Expression and Purification*, v. 59, n. 1, p. 153–160, 2008.
- 60 BERGFORS, T. M. Protein crystallization. Oxford: *International University line*, 1999.
- 61 LESLIE, A.G. The integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallographica D*, v. 62, n. 10, p. 48-57, 2006.
- 62 EVANS P. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallographica D*, v. 62, n. 10, p.72-82, 2005.
- 63 FRENCH, G. S.; WILSON, K.S. On the treatment of negative intensity observations. *Acta Crystallographica A*, v.34, p.517–525, 1978.
- 64 STORONI, L. C.; MCCOY, A. J.; READ, R. J. Likelihood-enhanced fast rotation functions. *Acta Crystallographica D*, v. 60, n. 3, p.432-438, 2004.
- 65 ADAMS, P.D. et al. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination *Acta Crystallographica D* v. 58, n. 11, p.1948-1954, 2002.
- 66 EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica D*. v. 60, n. 12, p. 2126-2132, 2004.
- 67 LASKOWSKI, R. A. et al. Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied. Crystallography*, v. 26, n.2, p. 283-291, 1993
- 68 THOMPSON, J. D. The clustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 24, p.4876-4882, 1997.
- 69 EDGAR, R. C. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, v.32, n.5, p. 1792-97, 2004.
- 70 THEOBALD, L. D.; WUTTKE, D. S. Theseus: maximum likelihood superpositioning and analysis of macromolecular structures. *Bioinformatics*, v. 22, n.17, p. 2171-2172, 2006.
- 71 DELANO, W.L. The PyMOL molecular graphics system. *San Carlos*: DeLano Scientific, 2002.
- 72 BEITZ, E. TEXshade: shading and labeling multiple sequence alignments using latex. *Bioinformatics*, v.16, p. 135–139, 2000.
- 73 KLEYWEGT, G. J. Les amis d"O. CCP4/ESF-EACBM *Newsletter on Protein Crystallography*, v.34, p. 5-8. [http://xray.bmc.uu.se/usf/factory_8.html] 1997.

- 74 MATTHEWS, B.W. Solvent content of protein crystals. *Journal of Molecular Biology*, v. 33, p.491–497, 1968.

Anexos

Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbapap The stability and aggregation properties of the GTPase domain from human SEPT4[☆]

Wanuis Garcia^{a,*}, Nathalia C. Rodrigues^a, Mario de Oliveira Neto^a, Ana Paula Ulian de Araújo^a, Igor Polikarpov^a, Manami Tanaka^b, Tomoo Tanaka^c, Richard C. Garratt^{a,*}

^a Centro de Biotecnologia Molecular e Estrutural (CBME), Instituto de Física de São Carlos (IFSC), Universidade de São Paulo (USP), Brazil

^b National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Higashi, Tsukuba Science City, Ibaraki, Japan

^c Tokai University School of Medicine, Isehara, Kanagawa, 259-1193, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 March 2008

Received in revised form 5 June 2008

Accepted 7 June 2008

Available online xxxx

Keywords:

Septin

Circular dichroism

Metal ion

Unfolding intermediate

Chemical denaturation

Amyloid-like

Alzheimer's and Parkinson's diseases

ABSTRACT

The septins are a family of conserved proteins involved in cytokinesis and cortical organization. An increasing amount of data implicates different septins in diverse pathological conditions including neurodegenerative disorders, neoplasia and infections. Human SEPT4 is a member of this family and its tissue-specific ectopic expression profile in colorectal and urologic cancer makes it a useful diagnostic biomarker. Thermal unfolding of the GTPase domain of SEPT4 (SEPT4-G) revealed an unfolding intermediate which rapidly aggregates into amyloid-like fibers under physiological conditions. In this study, we examined the effects of protein concentration, pH and metals ions on the aggregation process of recombinant SEPT4-G using a series of biophysical techniques, which were also employed to study chemical unfolding and stability. Divalent metal ions caused significant acceleration to the rate of SEPT4-G aggregation. Urea induced unfolding was shown to proceed via the formation of a partially unfolded intermediate state which unfolds further at higher urea concentrations. The intermediate is a compact dimer which is unable to bind GTP. At 1 M urea concentration, the intermediate state was plagued by irreversible aggregation at temperatures above 30 °C. However, higher urea concentration resulted in a marked decay of the aggregation, indicating that the partially folded structures may be necessary for the formation of these aggregates. The results presented here are consistent with the recently determined crystal structure of human septins and shed light on the aggregation properties of SEPT4 pertinent to its involvement in neurodegenerative disease.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Septins are a conserved group of GTP-binding and hetero-filament forming proteins initially identified in *Saccharomyces cerevisiae*, and later found also in most eukaryotic organisms [1–3]. They are important for cytokinesis [4,5] and membrane trafficking [3,6], but the molecular mechanisms by which these functions operate is still not well understood. Septins purified from yeast, *Drosophila* and mammalian brain tissue form hetero-filaments composed of at least three different septin polypeptides. The sequences of these proteins have a characteristic structure: an N-terminal domain which is variable in both sequence and length, a conserved central GTPase domain and, with few exceptions, a C-terminal domain predicted to include a coiled-coil [7]. Between the first and second domains, there is typically a short polybasic region which has been described as responsible for membrane interaction [8]. The conserved central region contains Ras-like GTP-binding motifs [9], and both GTP binding and its hydrolysis

have been experimentally demonstrated for several septins *in vitro* [8,10,11]. A recent paper presents the structures of human SEPT2–315 (human SEPT2 lacking 46 residues of the predicted coiled-coil region) at 3.4 Å and the heterotrimeric human SEPT2/SEPT6/SEPT7 complex at 4.0 Å [12]. Both form filaments as a consequence of crystal packing interactions in which adjacent subunits interact via one of two possible interfaces: the G-interface close to the nucleotide binding site and the N/C interface which includes elements from both termini of the polypeptide chain [12].

As well as progress in understanding the biochemistry and physiology of septins, insights have come from the potential role of septins in disease [13–17]. For example, several septins have been implicated in neurological diseases, neoplasia and, recently, in infection [18]. SEPT4 (NCBI accession number NP_004565) is a member of the mammalian septin family normally expressed almost exclusively in brain tissue [13,14] but with a significant ectopic expression profile in colorectal and urologic cancer as well as malignant melanoma [15]. Several different isoforms are known, including Bradeion- α , Bradeion- β [14], PNU2L2 [19,20] and ARTS [21], and a unifying nomenclature has been recently proposed [22]. Although the physiological relevance of these isoforms is largely unknown, the ectopic expression profile of SEPT4 has nonetheless led to its application as a useful diagnostic biomarker [23]. Furthermore,

[☆] This work was supported by FAPESP via a grant to the Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: wanuis@ifsc.usp.br (W. Garcia), richard@ifsc.usp.br (R.C. Garratt).

¹ Present address: Laboratoire de Physique des Solides, Université Paris, Orsay, France.

using anti-peptide antibodies against SEPT4-derived sequences, human SEPT4 has been reported to accumulate in tau-based filamentous deposits and cytoplasmic inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases respectively [16,17]. Furthermore, the latter has been related to environmental etiological agents including metal ions such as manganese, copper, mercury and aluminium, which are considered risk factors for the disease [24]. Although the evidence for the association of SEPT4 with such deposits is only rather sketchy and its pathological relevance poorly understood, the possibility that their formation may be related to the existence of intermediate structures which appear during protein folding, unfolding, misfolding or aggregation, would seem to justify the need for a better understanding of such phenomena in the case of SEPT4, particularly with respect to the presence of different metal ions. Indeed, we have recently demonstrated the formation of amyloid-like aggregates by the GTPase domain of SEPT4 *in vitro* [25].

Intermediates of the protein folding/unfolding process can be captured by mild denaturing conditions, such as changes in pressure, temperature, small variations in pH, and the addition of small amounts of chaotropic agents such as urea and guanidinium hydrochloride [26,27]. The conformational changes which these treatments induce can frequently be conveniently accompanied by means of spectroscopic techniques such as fluorescence and circular dichroism (CD) spectroscopies [28,29].

In this paper, we present the results of analysis of the effect of protein concentration, pH and metal ions (monovalent, divalent and trivalent) on the aggregation properties of human recombinant SEPT4-G *in vitro*, analogous to that observed for α -synuclein [24]. Metal ions, especially divalent ones, are shown to directly accelerate the rate of SEPT4-G aggregation. We also report studies of the chemical unfolding and stability of SEPT4-G and the results indicate the existence of an intermediate state present during chemical unfolding. These biophysical studies can be expected to provide insights into the understanding of the stability of septins and their component domains and their relationship to a series of important physiological and pathological processes.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The bacterial expression vector pET28a(+) and Ni-NTA resin were purchased from Novagen. The Superdex-200 resin and native gels for electrophoresis (8–25% (w/v) gradient polyacrylamide) were purchased from Amersham Pharmacia Biotech (GE-Healthcare). Guanosine-5'-triphosphate (GTP), protein standards used as SDS-PAGE markers, ANS (1-anilino-naphthalene-8-sulfonate) and ThT (Thioflavin-T) were purchased from Sigma. All other chemical reagents used in this study were of analytical grade (Sigma, Amersham).

2.2. Expression and purification of the recombinant GTPase domain of human SEPT4 (SEPT4-G)

The GTPase domain of SEPT4 (SEPT4-G, residues 144–416) was used for this study because of its solubility and expression level in the heterologous system used [30]. The expression and purification of SEPT4-G were carried out as described previously with minor modifications [30], and the purity of the final product verified by SDS-PAGE. The final protein was stored in 25 mM Tris-HCl, pH 7.8 buffer containing 5% glycerol. The SEPT4-G concentration, in all cases, was determined using a U-2001 Hitachi UV-visible spectrophotometer, by measuring the UV absorbance at 280 nm in the presence of 6 M urea and employing a theoretical extinction coefficient of $21,980 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, based on the amino acid composition [31]. The nucleotide content was estimated using the method described by Seckler et al. [32].

2.3. Thioflavin-T fluorescence assay

SEPT4-G aggregation was monitored using Thioflavin-T (ThT) fluorescence as a function of protein concentration, in several pHs or in the presence of different metal ions. The chloride salts of the metal ions were initially prepared as stock solutions of 250 mM with 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 buffer containing 5% glycerol. Appropriate aliquots of these stocks were added to the protein solution to a final concentration of 2 mM. SEPT4-G at 13 μM in 25 mM Tris-HCl, pH 7.8 buffer containing 5% glycerol was incubated with 60 μM ThT and 2 mM of different metal ion chlorides (NaCl, KCl, MnCl_2 and CaCl_2) for 30 min at 4 °C. The excitation wavelength used was 450 nm and the emission measured at 482 nm. Measurements were made at 30 °C. The emission was collected in each condition for a period of approximately 1 h and 30 min.

2.4. Intrinsic fluorescence spectroscopy

SEPT4-G at 10 μM and different urea concentrations (0–6.0 M) were used in all experiments. All experiments were carried out at least three times at 16 °C, in 25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.8, containing 20 mM NaCl, 0.1 mM EDTA and 5% glycerol in a steady-state spectrofluorimeter, model K2 ISS, equipped with a refrigerated circulator. Intrinsic fluorescence spectra were obtained by excitation at 295 nm and the emission was monitored from 300 to 450 nm. The buffer contribution was subtracted in all of the experiments. The fluorescence spectral center of mass (average emission wavelength, λ_{cm}) was calculated according to the equation:

$$\lambda_{\text{cm}} = \frac{\sum \lambda I(\lambda)}{\sum I(\lambda)} \quad (1)$$

where λ is the emission wavelength, and $I(\lambda)$ represents the fluorescence intensity at wavelength λ .

2.5. Circular dichroism spectroscopy (CD)

CD spectra of SEPT4-G at 6 μM (at 16 °C) were obtained at various pH values using a J-715 Jasco spectropolarimeter equipped with a temperature control device. To cover a pH range between 3 and 10 acetate–borate–phosphate were chosen as buffers and prepared at a final concentration of 25 mM. Chemical unfolding of SEPT4-G was also monitored by far-UV CD spectroscopy. CD spectra were the average of 32 accumulations, using a scanning speed of 20 nm min^{-1} , a spectral bandwidth of 1 nm, and a response time of 1 s. The SEPT4-G concentration was approximately 10 μM in 25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.8, containing 20 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, and 5% glycerol. All experiments were carried out in triplicate. Quartz cuvettes of 1 mm path length were used for far-UV CD measurements at 16 °C. Chemical denaturation of SEPT4-G was characterized by measuring the ellipticity change at 221 nm induced by the increase in urea concentration from 0 to 6 M. CD spectra were obtained on a degree ellipticity scale. The buffer contribution was subtracted in all of the experiments. The fraction of denatured protein, f_d , was calculated from the relationship:

$$f_d = \frac{(\theta_n - \theta_{\text{obs}})}{(\theta_n - \theta_d)} \quad \text{and} \quad f_d + f_n = 1 \quad (2)$$

in which θ_{obs} is the ellipticity obtained at a particular temperature and θ_d and θ_n are the values of the ellipticity characteristic of the denatured and native states respectively.

2.6. Nucleotide release

Samples of SEPT4-G at a concentration of 12 μM in 25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.8, containing 20 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 5% glycerol were incubated at 16 °C for 90 min in the absence or presence of 1 M urea,

and subsequently centrifuged using Millipore concentrators (10-kDa cutoff). The absorption spectrum of the filtrate was measured from 240 nm to 330 nm using a U-2001 Hitachi UV-Visible spectrophotometer in order to assess its nucleotide content.

2.7. ANS fluorescence assay

SEPT4-G at 10 μ M and different urea concentrations, varying from 0 to 6 M, in 25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.8, containing 20 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, and 5% glycerol were used in all experiments. For those experiments performed in the presence of ANS (50 μ M) the excitation wavelength was at 360 nm and the emission spectrum was collected from 400 to 600 nm. The intensity of the ANS interaction was monitored from the emission intensity measured at 464 nm (after subtraction of the buffer contribution) and determined as a function of urea concentration. All experiments were carried out in triplicate at 16 °C.

2.8. Right-angle light scattering

SEPT4-G (10 μ M) in 25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.8, containing 20 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 5% glycerol and different urea concentrations (0 M, 0.9 M, 1.35 M, 2.85 M and 6.0 M) were centrifuged (13,000 $\times$ g for 10 min at 4 °C) and placed in a 0.5 cm path length quartz cuvette in a steady-state spectrofluorimeter, model K2 ISS, equipped with a refrigerated circulator which was maintained at either 16 °C or 37 °C. The sample was illuminated with 350 nm light, and the intensity of the scattering radiation at the same wavelength was measured at 90° for approximately 45 min. All data were analyzed with the Origin 7.0 software using intensity measurements in arbitrary units after the light scattering by buffer had been subtracted.

2.9. Analysis of SEPT4-G by native gel electrophoresis

SEPT4-G (~30 μ M), in the absence or presence of 1 M urea, was subjected to electrophoresis on an 8–25% (w/v) gradient polyacrylamide gel at pH 8.8 using the Phast System (Amersham Bioscience) at 16 °C, and subsequently stained following standard protocols. This analysis was undertaken to verify the monodispersity of SEPT4-G in both the absence and presence of urea.

2.10. Small angle X-ray scattering

The SEPT4-G concentrations used for small angle X-ray scattering (SAXS) measurements were approximately 8 and 4 mg/mL in 25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.8, containing 10 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 5% glycerol and different urea concentrations (0–4 M). The samples were centrifuged for 15 min at 13,000 $\times$ g (at 4 °C) prior to measurement. All data were collected on the SAXS synchrotron beamline of the LNLS (Campinas, Brazil) [33]. The wavelength of the incident monochromatic X-ray beam was $\lambda=1.488$ Å. A 1D X-ray position sensitive detector (PSD) was utilized to record the scattered intensity as a function of the modulus of the scattering vector q (here $q=4\pi\sin\theta/\lambda$, where θ is half the scattering angle). The parasitic scattering from air and beamline windows were subtracted from the total measured intensities. The sample-to-detector distance (1031.5 mm) was adjusted in order to record the scattering intensity for q values ranging from 0.1 to 2.5 nm⁻¹. The samples were loaded into cells made of two thin parallel mica windows and kept at 16 °C during the measurements. Data analysis was performed using the GNOM program package [34,35] and model simulations were done using the program DAMMIN [36,37].

3. Results and discussion

In a previous work we have demonstrated that an intermediate generated between 30 and 40 °C during thermal unfolding of SEPT4-G

has a tendency to form amyloid-like aggregates [25]. In the present study, we examined the effect of protein concentration, pH and various metals on this aggregation process as well as chemically induced unfolding.

The histological dye ThT is widely used for the detection of amyloid fibrils [38] and is believed to interact specifically and rapidly with the crossed β -sheet structure common to such structures. The effect of SEPT4-G concentration on the aggregation process at 30 °C is illustrated in Fig. 1A. The aggregation process is rapid and shows a shorter lag phase than is typically observed [24]. Fig. 1B shows that an increase in the protein concentration resulted in a decrease in the value of t_{50} (the time necessary for the fluorescence to reach 50% of its maximal value). The simplest explanation for this fact is that increasing the protein concentration leads to a consequent increase in the concentration of partially folded intermediates which become subsequently sequestered into fibrils as they grow. A similar observation has been made in the case of α -synuclein, where it has been shown that the rate of aggregation is also metal-ion dependent [24].

Given that α -synuclein and SEPT4 are observed simultaneously in inclusion bodies in Parkinson's disease, it is of interest to investigate whether metal ions also affect the formation of the amyloid-like aggregates described here. Therefore, their rate of formation was monitored in the presence of mono, di, and trivalent cations. Fig. 2 shows that the presence of 2 mM divalent metals ions (Mn^{2+} and Ca^{2+})

Fig. 1. The effect of concentration on the kinetics of fibril formation of human recombinant SEPT4-G. (A) Kinetics of fibrillation at different SEPT4-G concentrations monitored by ThT fluorescence. Protein concentrations were from top to bottom as follows: 26, 13, 6.50 and 3.24 μ M in 25 mM Tris-HCl, pH 7.8 containing 5% glycerol. Measurements were performed at 30 °C. (B) t_{50} as a function protein concentration.

Fig. 2. Kinetics of SEPT4-G fibril formation in the presence of metal ions. SEPT4-G was incubated at 30 °C in 25 mM Tris-HCl, pH 7.8 buffer containing 5% glycerol in the presence of the indicated metals (2 mM), as their chloride salts. Fibril formation was monitored by the increase in ThT fluorescence at 482 nm. Control in the absence of metals (solid line), Na⁺ (short dash), K⁺ (dash dot), Mg²⁺ (dot) and Ca²⁺ (dash).

significantly accelerated the aggregation process. In the presence of Mn²⁺ and Ca²⁺ the t_{50} is approximately threefold higher than the control. In contrast, with monovalent ions (Na⁺ and K⁺) no variation in

the aggregation process was observed, indicating that these cations had minimal stimulatory effect. In the presence of trivalent ions (Al³⁺ and Fe³⁺), on the other hand, the aggregation process appears to be extremely rapid and leads to almost instantaneous precipitation in the form of amorphous aggregates unable to bind ThT (data not shown). This behavior is rather different to that seen in the case of α -synuclein, where fiber formation is a much slower process to that observed for SEPT4 and the influence of trivalent or divalent metals is rather similar.

One possible explanation is that divalent metal ions may aid in stabilizing interactions between partially unfolded monomers within the growing fiber. Indeed, in these cases, amyloid-like fiber formation can be observed by electron microscopy (see Supplementary material). This observation may be pertinent to the formation of deposits in neurodegenerative diseases since environmental, rather than genetic factors, including metal ions (manganese, copper, lead, mercury, and aluminium) have been implicated in the origin of Parkinson's disease [24].

Fig. 3A and B represents the far-UV CD spectra of human recombinant SEPT4-G measured at different pH values at 16 °C. At neutral pH, the protein possesses a far-UV CD spectrum typical of a structure with a mixed regular secondary structure as anticipated from the recently determined crystal structure [12,30]. As the pH was decreased, changes were observed in the shape of the spectrum reflecting a pH-induced loss of regular secondary structure. However, there was little change in the far-UV CD spectrum between pH 8 and 9.

Fig. 3. Effect of pH on the secondary structure and aggregation of recombinant SEPT4-G. (A) Far-UV CD spectra as a function of pH. The pH values were 3 (dash), 4 (dot), 5 (dash dot) and 6 (short dash). (B) Far-UV CD spectra as a function of pH. The pH values were 7 (solid), 8 (dash), 9 (dot) and 10 (dash dot). (C) Kinetics of fibrillation monitored by the enhancement of ThT fluorescence intensity. Measurements were performed at 30 °C and pH 3 (■), 4 (○), 5 (▲) and 6 (▽). (D) Kinetics of fibrillation monitored by the enhancement of ThT fluorescence intensity. Measurements were performed at 30 °C and pH 7 (■), 8 (○), 9 (▲) and 10 (▽). In both (C and D), the data have been normalized to the maximum value (pH 8 data).

Fig. 3C and D represents time-dependent changes in the ThT fluorescence during the process of SEPT4-G fibril formation at 30 °C over the same pH range. Decreasing the pH (pH between 3 and 6) resulted in a marked decay or complete extinction of aggregation whilst increasing the pH resulted in its increase. Together, the CD and ThT fluorescence suggest that the maintenance of sufficient secondary structure is essential for amyloid-like aggregates to form as would be expected from current models for the amyloid fiber [39].

In order to better understand events involved in the unfolding of SEPT4-G and their relationship to the observed aggregation, we investigated its chemically induced unfolding in the presence of urea. The presence of two tryptophan residues in SEPT4-G (W222 and W367), which act as intrinsic probes, allowed us to follow the chemically induced unfolding process by accompanying the center of mass of the fluorescence emission spectrum [40]. Since aromatic amino acid residues are sensitive to the polarity of their immediate environment, changes to the center of mass (λ_{cm} , which represents the average energy of the emission spectrum) will reflect conformational changes induced in the protein. Fig. 4A shows that SEPT4-G in the absence of urea exhibited maximum emission at approximately 334 nm (characteristic of tryptophan residues buried inside the protein core) and suffered typical alterations to the spectrum as a function of urea concentration (Fig. 4B). Low concentrations of urea (<1 M) induced only a small red shift in the spectral center of mass whereas at values above ~4 M the two tryptophans are highly exposed to the buffer environment, allowing us to consider the

Fig. 4. Fluorescence spectroscopy. (A) The effect of urea induced unfolding on the tertiary structure of SEPT4-G. SEPT4-G samples were exposed to 0–6 M urea at 16 °C in 25 mM Tris–HCl buffer, pH 7.8, containing 20 mM NaCl, pH 7.8, and 5% glycerol. (B) Spectral center of mass as a function of urea concentration.

Fig. 5. Circular dichroism (CD). (A) Recombinant SEPT4-G was monitored by far-UV CD spectroscopy as a function of urea concentration. The SEPT4-G concentration was approximately 10 μ M in 25 mM Tris–HCl buffer, pH 7.8, containing 20 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, and 5% glycerol. Due to the increased absorption of urea at lower wavelengths several spectra are limited due to the poor signal-to-noise ratio. (B) Ellipticity changes at 221 nm (plotted as f_d) as a function of urea concentration. (C) Absorption spectrum from the filtrate after incubation of SEPT4-G for 90 min in the absence (dotted line) or presence (solid line) of 1 M urea.

protein completely unfolded (maximum fluorescence emission at ~350 nm). Fitting the data shown in Fig. 4B resulted in a $[urea]_{1/2}$ value (the urea concentration at which 50% of the protein molecules exist in the denatured state) of 2.8 ± 0.1 M, presenting no apparent intermediate state.

A well-known test of such a two-state transition is to examine whether changes in secondary structure occur in parallel with the changes in fluorescence. When we examined the secondary structure of SEPT4-G by far-UV circular dichroism as a function of urea concentration (Fig. 5), the changes were not coincident with the intrinsic fluorescence data and therefore with a two-state model. When the α -helical content was monitored via the negative CD signal at 221 nm (Fig. 5B), the secondary structure was observed to be stable up to about 0.5 M urea. This was followed by a marked increase in f_d around 0.6–0.75 M, and subsequently an intermediate state was then observed between 0.8 and 1.1 M, showing the native structure to be relatively labile. Finally an abrupt loss of secondary structure is observed above 1.5 M urea. At 6.0 M urea, the far-UV CD spectrum of SEPT4-G is characteristic of a protein that has lost its secondary structure (data not shown) and attempts to refold SEPT4-G revealed that the chemical denaturation, in the conditions described here, was an irreversible process.

This result directly implies the existence of an intermediate conformation which is detectably different from the native state but which still retains a significant amount of secondary structure. However, this intermediate no longer retains the capacity to bind guanine nucleotide. Fig. 5C shows that in the absence of urea (at 16 °C) there is no evidence of nucleotide in the filtrate indicating that it has remained bound to the protein whilst in the presence of 1 M urea, a typical nucleotide spectrum, with a maximum at 254 nm, is observed for the filtrate indicating that nucleotide has been released from the protein under these conditions. A similar observation has been described for the intermediate observed during thermal unfolding of SEPT4-G [25] suggesting that nucleotide binding is intimately associated with the maintenance of the structural integrity of the GTPase domain. This is consistent with previous observations on other septins which indicate a likely relationship between GTP binding and septin stability [41,42]. Furthermore, similar properties have been described for an intermediate detected during the chemical unfolding of the GTPase tubulin [43].

The CD data therefore clearly reveal two aspects of the chemical denaturation of SEPT4-G which are not evident from the intrinsic fluorescence data. Firstly, it is apparent that structural alterations to the molecule begin to occur at much lower urea concentrations than those which cause the exposure of the two tryptophans. Secondly, the CD data readily permit the identification of a relatively stable intermediate along the unfolding pathway, which is not observable by fluorescence. The reduction in the intensity of the negative CD signal at 221 nm suggests that this intermediate has a lower relative α -helical content than the native structure.

To further characterize the properties of this intermediate state, we utilized an extrinsic fluorescence probe, ANS (Fig. 6). This probe binds noncovalently to hydrophobic regions of proteins and is sensitive to structural changes due to a large increase in the fluorescence quantum yield on binding [38]. Fig. 6A shows ANS spectra in the presence of SEPT4-G and varying urea concentrations. As can be seen, ANS shows a finite affinity for the protein even in the absence of urea, indicating the presence of exposed hydrophobic regions on the native structure. This rises significantly within a relatively narrow concentration range presenting a maximum increase of approximately twofold, corresponding to a urea concentration of 0.9 M, which is coincident with the concentration at which the intermediate was detected in the CD analysis. Beyond the sharp peak seen in Fig. 6B, at concentrations above approximately 1.5 M urea, there is a steady decline in ANS binding due to denaturation and, as expected, the addition of 4–6 M urea completely abolished the binding of ANS to SEPT4-G.

Taken together these spectroscopic data permit us to infer that concurrent with the loss of α -helical structure is an increase in the exposed hydrophobic surface which occurs while retaining the burial of both tryptophan residues within the hydrophobic core. The mild denaturing conditions used to observe the intermediate here which

Fig. 6. ANS fluorescence assay. (A) ANS fluorescence emission spectra in the presence of SEPT4-G at different urea concentrations. An increase significant in the capacity to bind ANS was observed between 0.8 and 1.1 M urea, suggesting the exposure of hydrophobic regions in the SEPT4-G. (B) Emission intensity at 464 nm as a function of urea concentration.

do not disrupt tryptophan burial suggest that it would be expected to present a relatively compact structure.

In order to address this point we have used small angle X-ray scattering in order to reconstruct the molecular envelope. The raw scattering data given in Fig. 7 clearly show that there are significant structural alterations to the molecule at both 1 M and 4 M urea (within the q range up to 2.0 nm^{-1}) as compared with the native. In the presence of denaturant, the quality of the scattering curves limited the usable data to less than 1.4 nm^{-1} . The radii of gyration (R_g) for SEPT4-G in its native state and in the presence of 1 M urea (corresponding to the plateau observed in the CD experiments) show a marginal increase in this parameter (from 3.15 to 3.34 nm) for the intermediate in the presence of denaturant (Table 1). Simultaneous with the increase in R_g , the maximum dimension of the intermediate is somewhat reduced, from 11.0 to 10.0 nm.

For a more sensitive analysis of the effects of urea on the global compactness of SEPT4-G, the SAXS data has been analyzed in terms of the Kratky plot (Fig. 7B) [44,45]. For a system with a compact shape and sharp phase boundaries, this plot shows a well defined curve with an initial rising portion and a well defined maximum [45,46]. On the other hand, the expected curve for a polymer in an extended or random coil conformation rises to a characteristic plateau. As can be seen the curves corresponding to the native structure and that in the presence of 1 M urea (the intermediate state) show the well defined maxima expected for compact structures. However, in the case of the

Fig. 7. Experimental solution scattering curves of SEPT4-G. (A) SAXS curves from SEPT4-G shown as the logarithm of the scattering intensity ($\log I$) versus the momentum transfer q scale. The desmeared experimental curves (open points) denote the SAXS data and the error bars indicate the standard uncertainty in the measurement, native SEPT4-G (○), 1 M urea (Δ) and 4 M urea (□). The solid curves correspond to the fit produced by GNOM. (B) Kratky plots for SEPT4-G following the same symbol convention as in (A).

intermediate an alteration to both the peak intensity and its position (to a slightly lower q value) indicates that alterations to the compactness of the structure have occurred. In the presence of 4 M urea the curve is typical of partially unfolded structures [44–46].

SEPT4-G is a dimer in solution and its maximum, as determined from the pair-distribution function ($P(r)$) is 11 nm (see Supplementary material), consistent with previous results [30] and with the recent crystal structure [12]. The intermediate, on the other hand, has a shorter maximum dimension than the native structure (10 nm) and is more symmetrical, indicating a more spherical particle. This becomes more evident after reconstruction of the molecular envelope using the program DAMMIN (see Supplementary material).

Table 1
SAXS parameters

Parameters	SEPT4-G		1.0 M urea	
	Exp	DAM	Exp	DAM
R_g (nm)	3.15 ± 0.02	2.99	3.34 ± 0.03	3.08
D_{max} (nm)	11.00 ± 0.50	11.01	10.00 ± 0.50	9.96
χ	–	1.37	–	1.15
Resolution (nm)	–	2.88	–	3.26

R_g is the radii of gyration, D_{max} is maximum dimension and χ is the discrepancy between the DAM (model) and experimental curve. Exp: calculated from the experimental data.

We have shown previously that the thermal unfolding of SEPT4-G generates an intermediate state which aggregates between 30 °C and 40 °C into amyloid-like structures [25]. On the other hand, the chemically induced intermediate between 0.8 and 1.1 M urea shows no tendency to aggregate at temperatures below 20 °C, despite the fact that it has clearly already undergone a structural transition. The fact that the intermediate does not aggregate under these conditions is shown by its migration on native gel electrophoresis (see Supplementary materials) and by the fact that we were able to characterize its molecular shape using SAXS. However, we were interested in knowing if the presence of urea interferes with the temperature induced aggregation described previously (Fig. 8).

In the absence of urea SEPT4-G presented the characteristic increase in light scattering described previously (solid line). At 0.9 M urea this process was accelerated (dash-dotted line) indicating the combined effect of both temperature and denaturant. In contrast, at higher urea concentrations (>1.35 M) the chemical denaturant reduces the rate of aggregation and finally eliminates it altogether (>2.8 M). The latter point corresponds to the urea transition concentration observed in the fluorescence experiments (Fig. 6B). Presumably low concentrations of urea act cooperatively with the effect of thermal unfolding to generate the intermediate state which is able to aggregate. However, higher concentrations of denaturant lead to destabilization of the aggregate-forming intermediate and finally to its denaturation, which coincides with the alteration to the environment of the tryptophans.

In conclusion, the unfolding behavior of SEPT4-G in urea was found to be a two-step process at pH 7.8 and 16 °C. The first step led to the formation of an intermediate conformation, stable at around 1 M urea, followed by a second step that was due to unfolding of the intermediate state. This intermediate presents the following characteristics: i) is a compact dimer, ii) no longer has the capacity to bind guanine nucleotides, iii) has a reduced secondary structure content, iv) presents an increased hydrophobic surface area, and v) partially retains the native tertiary structure in that both tryptophan residues remain buried inside the hydrophobic core. The properties of this intermediate suggest that it may not be identical to that generated by thermal unfolding [25]. Despite the fact that both intermediates have lost the capacity to bind guanine nucleotides, different from the thermally induced form, the chemically induced intermediate does not aggregate spontaneously, but requires an increase in temperature to do so. Fig. 9 attempts to summarize schematically the different conformational states described here.

Fig. 8. Right-angle light scattering. Time dependent light scattering of SEPT4-G in the presence of different urea concentrations at 37 °C. At low urea concentrations (0.9 M) the denaturant accelerates the rate of protein aggregation but at higher concentrations aggregation is reduced and then finally eliminated.

Fig. 9. Scheme for the chemical unfolding of SEPT4-G.

Further work is required to elucidate if these intermediates are representative or not of partially folded states relevant to the overall folding process of SEPT4 and their possible involvement in neurodegenerative diseases. Nevertheless, the current study contributes to a better understanding of the biophysical properties of septins, an aspect which has been largely neglected over recent years and which is fundamental to a fuller appreciation of their activities at the molecular level.

Acknowledgements

We thank Suzana Sculaccio and Derminda I. de Moraes for technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.bbapap.2008.06.005.

References

- J.A. Frazier, M.L. Wong, M.S. Longtine, J.R. Pringle, M. Mann, T.J. Mitchison, C. Field, Polymerization of purified yeast septins: evidence that organized filament arrays may not be required for septin function, *J. Cell. Biol.* 143 (1998) 737–749.
- C.M. Field, O. al-Awar, J. Rosenblatt, M.L. Wong, D. Alberts, T.J. Mitchison, A purified *Drosophila* septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity, *J. Cell. Biol.* 133 (1996) 605–616.
- S.C. Hsu, C.D. Hazuka, R. Roth, D.L. Foletti, J. Heuser, R.H. Scheller, Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments, *Neuron*, 20 (1998) 1111–1122.
- T.P. Neufeld, G.M. Rubin, The *Drosophila* peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins, *Cell*, 77 (1994) 371–379.
- M. Kinoshita, S. Kumar, A. Mizoguchi, C. Ide, A. Kinoshita, T. Haraguchi, Y. Hiraoka, M. Noda, Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures, *Genes Dev.* 11 (1997) 1535–1547.
- J. Dent, K. Kato, X.R. Peng, C. Martinez, M. Cattaneo, C. Poujol, P. Nurdén, A. Nurdén, W.S. Trimble, J. Ware, A prototypic platelet septin and its participation in secretion, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2002) 3064–3069.
- B. Kartmann, D. Roth, Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis, *J. Cell Sci.* 114 (2001) 839–844.
- J. Zhang, C. Kong, H. Xie, P.S. McPherson, S. Grinstein, W.S. Trimble, Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP, *Curr. Biol.* 9 (1999) 1458–1467.
- C. Field, D. Kellogg, Septins: structural polymers or signaling GTPases? *Trends Cell Biol.* 9 (1999) 387–394.
- P.J. Sheffield, C.J. Oliver, B.E. Kremer, S. Sheng, Z. Shao, I.G. Macara, Borg/septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 3483–3488.
- S. Hillebrand, W. Garcia, M.D. Cantú, A.P.U. Araújo, M. Tanaka, T. Tanaka, R.C. Garratt, E. Carrilho, *In vitro* monitoring of GTPase activity and enzyme kinetics studies using capillary electrophoresis, *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 92–97.
- M. Sirajuddin, M. Farkasovsky, F. Hauer, D. Kühlmann, I.G. Macara, M. Weyand, H. Stark, A. Wittinghofer, Structural insight into filament formation by mammalian septins, *Nature* 449 (2007) 311–315.
- H. Xie, M. Surka, J. Howard, W.S. Trimble, Characterization of the mammalian septin H5: distinct patterns of cytoskeletal and membrane association from other septin proteins, *Cell Motil. Cytoskeleton*, 43 (1999) 52–62.
- M. Tanaka, T. Tanaka, H. Kijima, J. Itoh, T. Matsuda, S. Hori, M. Yamamoto, Characterization of tissue- and cell-type-specific expression of a novel human septin family gene, Bradeion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286 (2001) 547–553.
- T. Tanaka, H. Kijima, J. Itoh, T. Matsuda, T. Tanaka, 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 (2002) 483–488.
- A. Kinoshita, M. Kinoshita, H. Akiyama, H. Tomimoto, I. Akiyuchi, S. Kumar, M. Noda, J. Kimura, Identification of septins in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease, *Am. J. Pathol.* 153 (1998) 1551–1560.
- M. Ihara, H. Tomimoto, H. Kitayama, Y. Morioka, I. Akiyuchi, H. Shibasaki, M. Noda, M. Kinoshita, Association of the cytoskeletal GTP-binding protein Sept4/H5 with cytoplasmic inclusions found in Parkinson's disease and others synucleinopathies, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 24012–24095.
- P. Hall, S. Russell, The pathobiology of the septin gene family, *J. Pathol.* 204 (2004) 489–505.
- P. Paavola, N. Horelli-Kuitunen, A. Palotie, L. Peltonen, Characterization of a novel gene, PNUIT2, on human chromosome 17q22–23 and its exclusion as the Meckel syndrome gene, *Genomics* 55 (1999) 122–125.
- B. Zieger, H. Tran, I. Hainmanna, D. Wunderle, A. Zgaga-Griesz, S. Blaser, J. Ware, Characterization and expression analysis of two human septin genes, PNUIT1 and PNUIT2, *Gene* 261 (2000) 197–203.
- S. Larisch, Y. Youngsuk, R. Lotan, H. Kerner, S. Eimerl, W.T. Parks, Y. Gottfried, S.B. Refeff, M.P. Caestecker, D. Danielpour, N. Book-Melamed, R. Timberg, C.S. Duckett, R.J. Lechleider, H. Steller, J. Orly, S. Kim, A.B. Roberts, A novel mitochondrial septin-like protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif, *Nat. Cell Biol.* 2 (2000) 915–921.
- I.G. Macara, R. Baldarelli, C.M. Field, M. Glotzer, Y. Hayashi, S.C. Hsu, M.B. Kennedy, M. Kinoshita, M. Longtine, C. Low, L.J. Maltais, L. McKenzie, T.J. Mitchison, T. Nishikawa, M. Noda, E.M. Petty, M. Peifer, J.R. Pringle, P.J. Robinson, D. Roth, S.E. Russell, H. Stuhlmann, M. Tanaka, T. Tanaka, W.S. Trimble, J. Ware, N.J. Zeleznik-Le, B. Zieger, Mammalian septins nomenclature, *Mol. Biol. Cell* 13 (2002) 4111–4113.
- M. Tanaka, T. Tanaka, S. Matsuzaki, Y. Seto, T. Matsuda, K. Komori, J. Itoh, H. Kijima, K. Tamai, M. Shibayama, Y. Hashimoto, H. Nakazawa, H. Toma, Rapid and quantitative detection of human septin family Bradeion as a practical diagnostic method of colorectal and urologic cancers, *Med. Sci. Monit.* 9 (2003) CR2–CR9.
- V.N. Uversky, J. Li, A.L. Fink, Metal-triggered structural transformations, aggregation and fibrillation of human α -synuclein, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 44284–44296.
- W. Garcia, A.P.U. Araújo, F. Lara, D. Foguel, M. Tanaka, T. Tanaka, R.C. Garratt, An intermediate structure in the thermal unfolding of the GTPase domain of human septin 4 (SEPT4/Bradeion-b) forms amyloid-like filaments *in vitro*, *Biochemistry* 46 (2007) 11101–11109.
- D.N. Brems, Solubility of different folding conformers of bovine growth hormone, *Biochemistry* 27 (1988) 4541–4546.
- A.R. Fersht, V. Daggett, Protein folding and unfolding at atomic resolution, *Cell*, 108 (1999) 573–582.
- J.M. Sanz, A.R. Fersht, Rationally designing the accumulation of a folding intermediate of barnase by protein engineering, *Biochemistry* 32 (1993) 13584–13592.
- C.M. Dobson, Oxford University press, New York. (2000) 1–33.
- W. Garcia, A.P.U. Araújo, M.O. Neto, M.R.M. Ballesterio, I. Polikarpov, M. Tanaka, T. Tanaka, R.C. Garratt, Dissection of a human septin: definition and characterization of distinct domains within human SEPT4, *Biochemistry* 45 (2006) 13918–13931.
- S.C. Gill, P.H. von Hippel, Calculation of proteins extinction coefficients from amino acid sequence data, *Anal. Biochem.* 182 (1989) 319–326.
- R. Seckler, G.M. Wu, S.N. Timasheff, Interactions of tubulin with guanylyl-(beta-gamma-methylene)diphosphonate-formation and assembly of a stoichiometric complex, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 7655–7661.
- G. Kellermann, F. Vicentin, E. Tamura, M. Rocha, H. Tolentino, A. Barbosa, A. Craievich, I. Torriani, The small-angle X-ray scattering beamline of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory, *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997) 880–883.
- D.I. Svergun, A.V. Semenyuk, L.A. Feigin, Small-angle-scattering-data treatment by the regularization method, *Acta crystallogr.* 44 (1988) 244–250.
- D.I. Svergun, Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria, *J. Appl. Crystallogr.* 25 (1992) 495–503.
- D.I. Svergun, Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing, *Biophys. J.* 76 (1999) 2879–2886.
- M.V. Petoukhov, D.I. Svergun, New methods for domain structure determination of proteins from solution scattering data, *J. Appl. Crystallogr.* 36 (2003) 540–544.
- S. Srisailam, H.M. Wang, T.K.S. Kumar, D. Rajalingam, V. Sivaraja, H.S. Sheu, Y.C. Chang, C. Yu, Amyloid-like fibril formation in an all beta-barrel protein involves the formation of partially structured intermediate(s), *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 19027–19036.
- F. Chiti, C.M. Dobson, Protein misfolding, functional amyloid, and human disease, *Annu. Rev. Biochem.* 75 (2006) 333–366.
- N.M. Nichols, K.S. Matthews, p53 unfolding detected by CD but not by tryptophan fluorescence, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288 (2001) 111–115.
- A.M. Vrabioiu, S.A. Gerber, S.P. Gygi, C.M. Field, T.J. Mitchison, The majority of the *Saccharomyces cerevisiae* septin complexes do not exchange guanine nucleotides, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 3111–3118.
- Y. Huang, M.C. Surka, D. Reynaud, C. Pace-Asciak, W.S. Trimble, GTP binding and hydrolysis kinetics of human septin 2, *FEBS J.* 273 (2006) 3248–3260.
- S. Guha, B. Bhattacharyya, Refolding of urea-denatured tubulin: recovery of native-like structure and colchicine binding activity from partly unfolded states, *Biochemistry* 36 (1997) 13208–13213.
- S. Doniach, J. Basile, T. Garel, H. Orland, Partially folded states of proteins – characterization by X-ray-scattering, *J. Mol. Biol.* 254 (1995) 960–967.
- O. Glatter, O. Kratky, Small Angle X-ray Scattering, Academic Press, Inc, New York, 1982.
- G.V. Semisotnov, H. Kihara, N.V. Kotova, K. Kimura, Y. Amemiya, K. Wakabayashi, I.N. Serdyuk, A.A. Timchenko, K. Chiba, K. Nikaido, T. Ikura, K. Kuwajima, Protein globularization during folding. A study by synchrotron small-angle X-ray scattering, *J. Mol. Biol.* 262 (1996) 559–574.

Crystallization and preliminary X-ray diffraction
analysis of a glutathione *S*-transferase from *Xylella*
fastidiosa

Wanius Garcia,^{a*‡} Regiane F.
Travensolo,^{b‡} Nathalia C.
Rodrigues,^a João R. C. Muniz,^a
Célia S. Caruso,^b Eliana G. M.
Lemos,^c Ana Paula U. Araujo^a
and Emanuel Carrilho^{b*}

^aLaboratório de Biofísica Molecular 'Sérgio Mascarenhas', Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, Brazil, ^bGrupo de Bioanalítica, Microfabricação e Separações, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, Brazil, and ^cLaboratório de Bioquímica de Microrganismos e de Plantas, Departamento de Tecnologia, UNESP, Jaboticabal, Brazil

‡ These authors contributed equally to this work.

Correspondence e-mail: wanius@if.sc.usp.br, emanuel@iqsc.usp.br

Received 4 October 2007

Accepted 23 December 2007

Glutathione *S*-transferases (GSTs) form a group of multifunctional isoenzymes that catalyze the glutathione-dependent conjugation and reduction reactions involved in the cellular detoxification of xenobiotic and endobiotic compounds. GST from *Xylella fastidiosa* (xfGST) was overexpressed in *Escherichia coli* and purified by conventional affinity chromatography. In this study, the crystallization and preliminary X-ray analysis of xfGST is described. The purified protein was crystallized by the vapour-diffusion method, producing crystals that belonged to the triclinic space group *P*1. The unit-cell parameters were $a = 47.73$, $b = 87.73$, $c = 90.74$ Å, $\alpha = 63.45$, $\beta = 80.66$, $\gamma = 94.55^\circ$. xfGST crystals diffracted to 2.23 Å resolution on a rotating-anode X-ray source.

1. Introduction

Xylella fastidiosa (Wells *et al.*, 1987) belongs to the Gram-negative bacteria and its growth, which is restricted to the xylem vessels of its host plants, has been associated with disease in various plant species of economic importance (Hopkins, 1989). Understanding the complete genome sequence of *X. fastidiosa*, together with functional studies, has resulted in a series of hypotheses related to the mechanisms of pathogenicity, antioxidant response and detoxification pathways (Van Sluys *et al.*, 2002). Detoxification is important to protect a variety of cell components against reactive molecules, including antibiotics (Dainelli *et al.*, 2002).

The XF1210 ORF from *X. fastidiosa* that encodes the glutathione *S*-transferase enzyme (GST) with 205 amino acids (22.7 kDa) was chosen for this study based on its specific role in the biodegradative metabolism, detoxification and excretion of xenobiotic substrates (Konishi *et al.*, 2005). The glutathione *S*-transferases form a group of multifunctional isoenzymes that catalyze the glutathione-dependent conjugation and reduction reactions involved in the cellular detoxification of endobiotic compounds such as hormones, haem and bilirubin, as well as xenobiotic compounds including drugs and pesticides that often impair the catalytic activity of enzymes (Salinas & Wong, 1999; Sheehan *et al.*, 2001; Deponte & Becker, 2005). For example, bacterial GSTs have been implicated in the reductive dechlorination of pentachlorophenol by *Sphingomonas paucimobilis*, in the biodegradation of dichloromethane by a dehalogenase in *Methylophilus* sp. and in the degradation pathway of biphenyls in *Pseudomonas* (Mueller *et al.*, 1990; Bader & Leisinger, 1994; Hofer *et al.*, 1994).

GSTs have been classified based on biochemical and structural properties, including their catalytic activity towards CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene), a standard substrate for almost all GSTs (Rossjohn *et al.*, 1998; Travensolo *et al.*, 2008). In eukaryotes, the soluble GSTs have been grouped into several independent classes, *i.e.* α , κ , μ , ω , π , σ , θ and ζ (mammals), δ , ε and U (insects), λ , φ and τ (plants) and ρ (fish), on the basis of similarity of the N-terminal amino-acid sequence, substrate specificity, immunological cross-reactivity and structural properties (Mannervik *et al.*, 1985; Board *et al.*, 1997, 2000; Sawicki *et al.*, 2003; Hayes *et al.*, 2004; Kosloff *et al.*,

© 2008 International Union of Crystallography
All rights reserved

2006). However, only β -class GSTs have been identified in prokaryotes, with members having been isolated and characterized from bacteria such as *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptomyces griseus* (Di Ilio *et al.*, 1988; Iizuka *et al.*, 1989; Jung *et al.*, 1996; Dainelli *et al.*, 2002; Dhar *et al.*, 2003). The majority of prokaryotic GSTs have also been shown to possess peroxidase activity, to act as epoxide thiolases and to catalyse reactions in the metabolism of some compound (Bartels *et al.*, 1999).

Comparison of aligned GST sequences has shown that less than 30% of the amino acids are strictly conserved, although crystallographic studies have indicated that the overall polypeptide folds of the various classes of soluble GSTs are very similar (Dirr *et al.*, 1994; Armstrong, 1997; Dainelli *et al.*, 2002). The GST enzymes are dimeric, with each subunit divided into two domains: the N-terminal domain (domain I) adopts a α/β topology and provides most of the contacts with glutathione (GSH; G site), whereas the C-terminal domain (domain II) is completely α -helical and contains some of the residues that form the hydrophobic binding site (H site; Armstrong, 1997; Sheehan *et al.*, 2001; Dainelli *et al.*, 2002). The G and H sites are especially important because they define the substrate repertoire for a particular GST (Rossjohn *et al.*, 1998).

In order to understand the catalytic mechanism of glutathione S-transferase from *X. fastidiosa* (xfGST), we have undertaken the resolution of its structure. Here, we report the crystallization and diffraction data for recombinant xfGST.

2. Materials and methods

2.1. Protein expression and purification

The xfGST gene was amplified by polymerase chain reaction using specific primers (forward primer 5'-CGCATATGAAGTTGTACATCATGCCAGGCGCTTGCTC-3' and reverse primer 5'-GGAATTCTATCAGATCAGCCCTTCCGCCTGTAATGC-3') that were designed to generate products with vector cohesive overhangs (Travensolo *et al.*, 2008). The DNA encoding the GST was then subcloned into vector pET-28a(+) in *Nde*I and *Eco*RI sites; this was then used to transform *E. coli* DH5 α . The new vector construct was

named pET-GST and produced the recombinant protein in fusion with a His tag.

Recombinant glutathione S-transferase from *X. fastidiosa* (rxGST) was expressed in *E. coli* and purified as described elsewhere (Travensolo *et al.*, 2008). Briefly, BL21(DE3) cells harbouring the plasmid containing the xfGST insert were grown in 500 ml LB medium supplemented with kanamycin (50 μ g ml⁻¹) at 310 K until the optical density at 600 nm reached 0.6. Subsequently, the culture was induced with 0.4 mM IPTG and incubation was continued for an additional 4 h at the same temperature. After cell disruption by sonication at 277 K, the rxGST present in the soluble fraction was purified by nickel-affinity column (Novagen) chromatography and subsequent dialysis against a solution of 25 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer containing 20 mM NaCl. The protein purity exceeded 95% as judged by the presence of a single band on 15% SDS-PAGE (Travensolo *et al.*, 2008), with a molecular weight in close proximity to that for the predicted value for rxGST (~24.5 kDa including the His tag). Finally, the rxGST was concentrated to a final concentration of 15 mg ml⁻¹ using Centriprep-10 (Amicon). The protein concentration was determined from the UV absorbance at 280 nm using a theoretical extinction coefficient based on the amino-acid sequence composition (Gill & von Hippel, 1989). The extinction coefficient employed was $\epsilon_{280\text{ nm}} = 44\,920\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

2.2. Crystallization

Initial attempts to crystallize rxGST were performed at 291 K by hanging-drop vapour diffusion using the sparse-matrix screening method and Crystal Screens I and II (Hampton Research). Hanging drops containing 2 μ l protein solution (15 mg ml⁻¹ in 25 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer containing 20 mM NaCl and 5% glycerol) mixed with equal amounts of reservoir solution were equilibrated against 500 μ l reservoir solution. Crystals grew in about 10 d from a condition containing 28% PEG 6000, 100 mM HEPES pH 7.6 (Fig. 1).

Figure 1
Crystal of recombinant xfGST obtained by the hanging-drop vapour-diffusion technique using 100 mM HEPES pH 7.6, 28%(w/v) PEG 6000 as precipitant. Typical dimensions are 0.2 $\times$ 0.2 $\times$ 0.2 mm.

Figure 2
Typical diffraction pattern of the rxGST crystal with a 1 $^\circ$ oscillation exposure. The edge of the detector corresponds to a resolution of 2.00 $\text{\AA}$.

Table 1

Crystal parameters and data-processing statistics.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

Space group	<i>P</i> 1
Unit-cell parameters (Å, °)	<i>a</i> = 47.73, <i>b</i> = 87.73, <i>c</i> = 90.74, <i>α</i> = 63.45, <i>β</i> = 80.66, <i>γ</i> = 94.55
Resolution limits (Å)	30.01–2.23 (2.35–2.23)
Total no. of frames ($\Delta\varphi = 1^\circ$)	200
Mosaicity (°)	1.07
Total no. of reflections	117272 (15922)
Unique reflections	57152 (8104)
Multiplicity	2.1 (2.0)
<i>R</i> _{merge} (%)	9.0 (37.2)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	8.3 (1.9)
Completeness (%)	93.5 (89.4)

2.3. Data collection and processing

A single crystal was harvested using a nylon loop (Hampton Research) and transferred from the crystallization drop to 5 µl of a cryoprotection solution containing 5% ethylene glycol, 28% PEG 6000, 100 mM HEPES pH 7.6 for a few seconds. The crystal was then flash-cooled to 100 K in a nitrogen stream in order to prevent radiation damage during data collection. A diffraction data set was collected using a MAR345dtb image-plate detector mounted on a Rigaku Ultra X18 copper rotating-anode generator equipped with Osmic confocal MaxFlux optics. A total of 200 images were collected with a crystal-to-detector distance of 170.0 mm using the oscillation method with an oscillation range of 1° per image and an exposure time of 20 min. Raw data images were processed with *MOSFLM* (Leslie, 1992) and were scaled and merged with *SCALA* (Evans, 1993); amplitudes were estimated using *TRUNCATE* (French & Wilson, 1978).

3. Results and discussion

The *rx*/GST crystals belong to the triclinic system, with space group *P*1. Diffraction data extended to 2.23 Å resolution (Fig. 2) and crystal and data-processing statistics are summarized in Table 1. Using the known molecular weight of the monomer (24.5 kDa), a Matthews coefficient (*V*_M; Matthews, 1968) of 2.33 Å³ Da^{−1}, corresponding to a solvent content of 47.3%, was obtained assuming the presence of six molecules in the asymmetric unit. Molecular replacement using the X-ray structure of bacterial glutathione *S*-transferase from *Burkholderia xenovorans* (PDB code 2dsa; 37% amino-acid sequence identity) as a search model was carried out with *Phaser* (Storoni *et al.*, 2004). *Phaser* simulations converged to a clear solution with six molecules in the asymmetric unit and a *Z* score of 15.57 in the translation function after placement of the last molecule. The molecules are arranged as a trimer of dimers, in agreement with the known dimeric organization of GSTs in solution. Structural refinement is in progress.

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) e CAPES.

References

- Armstrong, R. N. (1997). *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 2–8.
- Bader, R. & Leisinger, T. (1994). *J. Bacteriol.* **176**, 3466–3473.
- Bartels, F., Backhaus, S., Moore, E. R. B., Timmis, K. N. & Hofer, B. (1999). *Microbiology*, **145**, 2821–2834.
- Board, P. G., Baker, R. T., Chelvanayagan, G. & Jermini, L. S. (1997). *Biochem. J.* **328**, 929–935.
- Board, P. G. *et al.* (2000). *J. Biol. Chem.* **275**, 24798–24806.
- Dainelli, B., Paludi, D., Dragani, B., Cocco, R., Principe, D. R., Petrucci, M., Mucilli, F., Faraone, A. & Aceto, A. (2002). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 916–920.
- Deponte, M. & Becker, K. (2005). *Methods Enzymol.* **401**, 240–252.
- Dhar, K., Dhar, A. & Rosazza, J. P. N. (2003). *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 707–710.
- Di Ilio, C., Aceto, A., Piccolomino, R., Allocati, N., Faraone, A., Cellini, L., Ravagnan, G. & Federico, G. (1988). *Biochem. J.* **255**, 971–975.
- Dirr, H., Reinemer, P. & Huber, R. (1994). *Eur. J. Biochem.* **220**, 645–661.
- Evans, P. R. (1993). *Proceedings of the CCP4 Study Weekend. Data Collection and Processing*, edited by L. Sawyer, N. Isaacs & S. Bailey, pp. 114–122. Warrington: Daresbury Laboratory.
- French, S. & Wilson, K. (1978). *Acta Cryst.* **A34**, 517–525.
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H. (1989). *Anal. Biochem.* **182**, 319–326.
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U. & Jowsey, I. R. (2004). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 51–88.
- Hofer, B., Backhaus, S. & Timmis, K. N. (1994). *Gene*, **144**, 9–16.
- Hopkins, D. L. (1989). *Annu. Rev. Phytopathol.* **22**, 271–290.
- Iizuka, M., Inoue, Y., Murata, K. & Kimura, A. (1989). *J. Bacteriol.* **171**, 6039–6042.
- Jung, U. H., Cho, J. Y. E., Seong, H. M., Kim, S. J., Kim, Y. & Chung, A. S. (1996). *J. Biochem. Mol. Biol.* **29**, 111–115.
- Konishi, T., Kato, K., Araki, T., Shiraki, K., Takagi, M. & Tamaru, Y. (2005). *Biochem. J.* **388**, 299–307.
- Kosloff, M. *et al.* (2006). *Proteins*, **65**, 527–537.
- Leslie, A. G. W. (1992). *Jnt CCP4/ESF-EACBM Newsl. Protein Crystallogr.* **26**.
- Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jensson, H., Tahir, M. K., Warholm, M. & Jornvall, H. (1985). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **82**, 7202–7206.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- Mueller, J. G., Chapman, P. J., Blattmann, B. O. & Pritchard, P. H. (1990). *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1079–1086.
- Rosjohn, J., Polekhina, G., Feil, S. C., Allocati, N., Masulli, M., De Ilio, C. & Parker, M. W. (1998). *Structure*, **6**, 721–734.
- Salinas, A. E. & Wong, M. G. (1999). *Curr. Med. Chem.* **6**, 279–309.
- Sawicki, R., Singh, S., Mondal, A., Benes, H. & Zimniak, P. (2003). *Biochem. J.* **370**, 661–669.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M. & Dowd, C. A. (2001). *Biochem. J.* **360**, 1–16.
- Storoni, L. C., McCoy, A. J. & Read, R. J. (2004). *Acta Cryst.* **D60**, 432–438.
- Travensolo, R. F., Garcia, W., Muniz, J. R. C., Caruso, C. S., Lemos, E. G. M., Carrilho, E. & Araújo, A. P. U. (2008). Submitted.
- Van Sluys, M. A., Monteiro-Vitorello, C. B., Camargo, L. E. A., Menck, C. F. M., Silva, A. C. R., Ferro, J. A., Oliveira, M. C., Setúbal, J. C., Kitajima, J. P. & Simpson, A. J. (2002). *Annu. Rev. Phytopathol.* **40**, 169–189.
- Wells, J., Raju, B. C., Jung, H. Y., Weisburg, W. G., Mandelco-Paul, L. & Brenner, D. J. (1987). *Int. J. Syst. Phytopathol.* **73**, 136–143.