UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

Ivo de Almeida Marques

**Estudos estruturais de septinas:
explorando interações entre subunidades de filamentos de
septinas humanas**

São Carlos

2010

Ivo de Almeida Marques

**Estudos estruturais de septinas:
explorando interações entre subunidades de filamentos de
septinas humanas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Física do Instituto de Física de São Carlos, da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título
de Doutor em Ciência.

Área de Concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Richard Charles Garratt

São Carlos

2010

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

Marques, Ivo de Almeida

Estudos estruturais de septinas: explorando interações entre
subunidades de filamentos de septinas humanas./Ivo de Almeida
Marques; orientador Richard Charles Garrat-- São Carlos, 2010.

145 p.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Física -
Área de concentração: Física Aplicada – opção Biomolecular) –
Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Septinas. 2. Coiled coil. 3. GT Pase. 4. Hetero filamento. 5.
Cristalografia. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ivo de Almeida Marques

Tese apresentada ao Instituto de Física de
São Carlos da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências.
Área de Concentração: Física Aplicada -
Opção: Física Biomolecular.

Aprovado(a) em: 01.12.2010

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a). Richard Charles Garratt

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Prof(a). Dr(a). Debora Foguel

Instituição: UFRJ

Assinatura

Prof(a). Dr(a). Sonia Maria de Freitas

Instituição: UnB

Assinatura

Prof(a). Dr(a). Jörg Kobarg

Instituição: ABTLuS

Assinatura

Prof(a). Dr(a). Shaker Chuk Farah

Instituição: IQ/USP

Assinatura

À pessoa mais linda e especial que já conheci.

Minha eterna namorada ...

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais, Paulo e Ilza, por terem me dado a dádiva da vida e por, mesmo à distância, me apoiarem durante estes anos de doutorado;
- À minha esposa Regiane, pelo amor, companheirismo, apoio, incentivo, paciência e compreensão;
- Ao professor Dr. Richard C. Garratt, pela orientação, incentivo e por ser um exemplo como cientista e professor;
- À Profa. Dra. Claudia E. Munte, pela hospitalidade na Alemanha, pela ajuda e, principalmente, pela amizade;
- Ao Dr. Napoleão F. Valadares, pela ajuda e por tentar fazer ciência como se deve;
- A TODOS os professores do IFSC/USP. Em especial aos professores: Ana Paula U. Araújo, Tito José, Humberto D’Muniz Pereira, Marcos V. A. S. Navarro e Eduardo H. Reboredo;
- A TODOS os demais funcionários do IFSC/USP. Em especial a Bel e a Andressa, por ajudarem a transformar um pseudo físico teórico em um quase cientista de jaleco branco;
- A TODOS os colegas e companheiros de doutorado com quem tive a oportunidade de conviver. Agradeço em especial a: Joci Neuby, Nayara Cavalcante, Mariana Odashima, Rejane Moreira, Heline Hellen, Larissa Romanello, Nathália Rodrigues, Lis Miotto, Assuero Faria, Fernando Alessandro, Fernando Bachega, B2, Júlio Damálio, Tiago Moda, Wânus Garcia, Daniel Leite, Leandro Ribeiro, Frederico Ferreira, Leandro Goto, Felipe Martins, Leonardo Lima, Rodrigo Silva, Edson Crusca, Daniel Silva e Mário Oliveira.
- Aos membros da banca;
- A CAPES, pelo apoio financeiro.

Ainda que eu falasse a língua dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine. E ainda que tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios a toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.

I Coríntios 13:1-2

RESUMO

MARQUES, I. A. **Estudos estruturais de septinas:** explorando interações entre subunidades de filamentos de septinas humanas 2010. 145 p. Tese (Doutorado em Ciencia) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Septinas constituem uma família conservada de proteínas de citoesqueleto pertencentes à superclasse das *P-loop* GTPases. Tais proteínas estão envolvidas em vários processos celulares. Em humanos, algumas septinas também estão relacionadas a casos de patologia. Suas seqüências são divididas em três domínios: domínio N-terminal, domínio GTPase e domínio C-terminal, que geralmente possui predição de *coiled coil*. A principal característica da família está na capacidade de seus membros formarem filamentos compostos por septinas diferentes. Em 2007, Sirajuddin et al apresentaram a primeira e única estrutura cristalográfica de um complexo de septinas, formado pelas septinas 2, 6 e 7. Embora os domínios C-terminal estivessem presentes, eles não apresentaram densidade eletrônica. Assim, a estrutura não trouxe informação estrutural sobre tais domínios. Atualmente, existem quatro estruturas de septinas depositadas no PDB: complexo 2/6/7 e três estruturas SEPT2 sem o C-terminal. Dada a inexistência de informações estruturais a nível atômico para os domínios C-terminal e baixa qualidade das poucas estruturas existentes, propusemos a obtenção de informações bioquímicas e estruturais dos domínios C-terminal de septinas humanas e a obtenção da estrutura cristalográfica de SEPT3-GC (GTPase mais C-terminal). Vale ressaltar que SEPT3 pertence ao único grupo de septinas que possui predição de não apresentar um *coiled coil* no C-terminal e para o qual não há nenhuma estrutura disponível. Expressamos e purificamos os domínios C-terminal de SEPT2, SEPT6 e SEPT7 (SEPT2-C, SEPT6-C e SEPT7-C). Mostramos que eles formam homo dímeros e que SEPT6-C e SEPT7-C formam um hetero dímero (K_D 15,8 nM), nomeado por SEPT67-C. Tanto SEPT6-C quanto SEPT7-C tendem a precipitar, ao passo que SEPT67-C e SEPT2-C (K_D 4 μ M) são estáveis à altas concentrações. Tentamos, sem sucesso, cristalizar SEPT2-C e SEPT67-C. Via ressonância magnética nuclear, vimos que SEPT2-C possui duas regiões dinamicamente diferentes, uma central, em α -hélice, e duas extremidades desestruturadas. Neste ponto, planejamos construções para as regiões centrais dos domínios C-terminal, nomeadas SEPT2-CC, SEPT4-CC, SEPT6-CC e SEPT7-CC, referente às septinas 2, 4, 6 e 7. Obtivemos cristais para SEPT2-CC, SEPT4-CC e SEPT6-CC. Contudo, resolvemos apenas a estrutura de SEPT4-CC, mostrando que a

construção forma um *coiled coil* anti-paralelo. Então, propusemos, pela primeira vez, um possível mecanismo de formação de ligações cruzadas entre filamentos de septinas. Por outro lado, obtivemos cristais para uma construção contendo os domínios GTPase e C-terminal de SEPT3 (SEPT3-GC) e resolvemos sua estrutura (2,9 Å). Vimos que SEPT3-GC forma filamentos no cristal, utilizando as mesmas duas interfaces já descritas anteriormente para as outras estruturas. Comparamos a estrutura obtida com estruturas da literatura e observamos diferenças significativas em algumas regiões, além de diferença em relação à orientação das duas subunidades adjacentes. Deve ser notado que a estrutura de SEPT4-CC é a primeira estrutura de um *coiled coil* de septina e que a estrutura de SEPT3-GC é a primeira estrutura de uma septina do grupo I. Em conclusão, o presente trabalho apresentou um conjunto de resultados os quais auxiliará no entendimento desta intrigante família de proteínas, inclusive em relação à formação de filamentos e as interações entre estes.

Palavras-chave: Septinas. *Coiled coil*. GTPase. Hetero filamento. Cristalografia.

ABSTRACT

MARQUES, I. A. **Structural studies of septins:** exploring interactions between subunits of filaments of human septins 2010. 145 p. Tese (Doutorado em Ciência) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Septins are a conserved family of cytoskeletal proteins belonging to the superclass of the P-loop GTPases, involved in various cellular processes. In humans, some septins are also linked to cases of pathology. Their sequences are divided into three domains: an N-terminal domain, a GTPase domain and a C-terminal domain, which usually is predicted to form a coiled coil. The main feature of the family is the ability of its members to form filaments composed of different septins. In 2007, Sirajuddin et al presented the first and only crystal structure of a complex of septins, formed by septins 2, 6 and 7. Although the C-terminal domains were present, they showed no electron density, indicating disorder. Thus, this structure provides little structural information concerning their nature. Currently, there are four septin structures deposited in the PDB: the 2/6/7 complex and three structures of SEPT2 lacking the C-terminal domain. Based on the absence of structural information at atomic resolution about the C-terminal domains and the low quality of the few existing structures we set out to characterize both biochemically and structurally the C-terminal domains of selected human septins as well as to obtain the crystal structure of SEPT3-GC (a construct containing the GTPase and C-terminal domains). It is noteworthy that SEPT3 belongs to the only group of septins that are predicted to lack the C-terminal coiled coil and for which no crystal structure is available. We have expressed and purified the C-terminal domains of SEPT2, SEPT6 and SEPT7 (SEPT2-C, SEPT6-C and SEPT7-C). We show that they form homo-dimers and that SEPT6-C and SEPT7-C form a hetero-dimer (K_D 15.8 nM), SEPT67-C. Both SEPT6-C and SEPT7-C were unstable, but SEPT67-C and SEPT2-C (K_D 4 μ M) were both stable at high concentrations. NMR measurements showed that SEPT2-C has two dynamically different regions, a central one which is α -helical, and two extremities which are unstructured. Constructs were designed for the central regions of the C-terminal domains of septins 2, 4, 6 and 7 (SEPT2-CC, SEPT4-CC, SEPT6-CC and SEPT7-CC). We have obtained crystals of SEPT2-CC, SEPT4-CC and SEPT6-CC and have solved the structure of SEPT4-CC which unexpectedly is observed to form an anti-parallel coiled coil. We use this observation to

propose, for the first time, a possible mechanism for the formation of cross-links between septin filaments. Crystals were obtained for SEPT3-GC its structure solved at 2.9 Å. We observe that SEPT3-GC forms filaments in the crystal, employing the same two interfaces previously described for other structures. We compare the structure obtained with those from the literature and observe significant differences in some regions of the molecule as well as differences in the relative orientation of the subunits. It should be noted that the structure of SEPT4-CC is the first structure of a septin coiled coil and that the structure of SEPT3-GC is the first structure of a septin from group I. In conclusion, this study presents results which will assist in the understanding of this intriguing protein family, including observations pertinent to filament formation and cross-linking.

Keywords: Septins. Coiled coil. GTPase. Hetero filament . Crystallography

Sumário

Capítulo 1 Introdução	19
1.1 Septinas	19
1.1.1 Definição da família das septinas	20
1.1.2 Septinas em metazoários	22
1.1.3 Estrutura primária das septinas humanas	23
1.1.4 Funções celulares das septinas	25
1.1.5 Septinas em patologias	28
1.1.6 Complexos formados por septina	29
1.2 Coiled coils	36
Capítulo 2 Objetivos	45
Capítulo 3 Metodologia	49
3.1 Subclonagens	49
3.2 Expressão e purificação dos domínios C-terminal das septinas do complexo 2/6/7	52
3.3 Filtração em gel e cross-linking químico	54
3.4 Espectroscopia de Dicroísmo Circular – CD	55
3.5 Ressonância Plasmônica de Superfície – SPR	57
3.6 Ultracentrifugação analítica	59
3.7 Cristalização	60
3.8 Coleta de dados e processamento para os cristais obtidos	62
3.9 Ressonância magnética nuclear para o domínio SEPT2-C	63
3.10 Análises <i>in silico</i> dos domínios C-terminal de septinas humanas	65
Capítulo 4 Resultados e discussões	69
4.1 Definições dos domínios C-terminal das septinas do complexo 2/6/7	69
4.2 Amplificação e clonagem dos domínios C-terminal das septinas do complexo 2/6/7	70

4.3 Expressão e purificação dos domínios C-terminal das septinas do complexo 2/6/7	71
4.4 Filtração em gel e cross-linking químico	76
4.5 Espectroscopia de Dicroísmo Circular – CD	79
4.6 Ressonância Plasmônica de Superfície – SPR	81
4.7 Ultracentrifugação analítica	84
4.8 Ensaio de cristalização para os domínios SEPT2-C e SEPT6-C/SEPT7-C	86
4.9 Ressonância magnética nuclear para o domínio SEPT2-C	87
4.10 Análises <i>in silico</i> dos domínios C-terminal de septinas humanas	91
4.11 Amplificação e clonagem dos domínios SEPT6-CC e SEPT7-CC	94
4.12 Expressão e purificação dos domínios SEPT6-CC e SEPT7-CC	95
4.13 Espectroscopia de Dicroísmo circular para as novas construções	97
4.14 Ensaio de cristalização para as novas construções	100
4.15 Coleta de dados no LNLS e processamento para os melhores cristais obtidos .	103
4.16 Coleta de dados no ESRF e processamento para os melhores cristais obtidos .	106
4.17 Análise da estrutura de SEPT4-CC e suas implicações	108
4.18 Cristalização, coleta de dados e processamento para SEPT3-GC	113
4.19 Análise da estrutura de SEPT3-GC e suas implicações	116

Capítulo 5 Apanhado geral e perspectivas	127
---	------------

Referências	131
--------------------------	------------

Apêndice A Estudos estruturais de adenilato quinases de <i>Schistosoma mansoni</i>	139
---	------------

Apêndice B Alguns dos demais trabalhos	145
---	------------

Capítulo 1

Introdução

The most beautiful thing we can experience is the mysterious. It is the source of all true art and all science.

Albert Einstein

Capítulo 1 Introdução

O capítulo de introdução está dividido em duas seções. Na seção 1.1 apresentaremos os principais aspectos da família de proteínas de septinas, partindo desde sua descoberta até as pesquisas mais recentes. Apontaremos também as lacunas de informação a respeito de estrutura e função para a família. Na seção 1.2 apresentaremos o motivo *coiled coil*, principais características e funções.

1.1 Septinas

Septinas constituem uma conservada família de proteínas de citoesqueleto pertencentes à superclasse das P-loop GTPases, ou seja, são proteínas que podem ligar e hidrolisar nucleotídeos de guanina (GTP). Tais proteínas foram inicialmente identificadas em *Saccharomyces cerevisiae* na forma de hetero-filamentos, sendo posteriormente encontradas também em vários outros eucariotos, com exceção de plantas. As seqüências de todos os membros desta família podem ser divididas em três domínios distintos: um domínio N-terminal variável, um domínio central conservado (com predição de possuir atividade de GTPase) e um domínio C-terminal variável, que geralmente inclui seqüências características de *coiled coils*. A principal característica da família está na capacidade de seus membros formarem filamentos compostos por septinas diferentes.

O primeiro grupo de genes de septinas identificado em levedura revelou-se importante para o processo normal de brotamento. Hoje, sabe-se que tais proteínas estão relacionadas com diversos processos celulares, por exemplo, exocitose, citocinese, tráfico de vesículas, segregação cromossômica e motilidade de células T. Em humanos, além do seu papel fisiológico, algumas septinas estão relacionadas a casos de patologia, como câncer e doenças neurodegenerativas.

1.1.1 Definição da família das septinas

No início da década de 1970 Hartwell, L.H. et al apresentaram uma série de estudos genéticos em *Saccharomyces cerevisiae* onde foram identificados vários genes que, quando mutados, geravam como fenótipo células onde o processo de divisão celular tornou-se sensível à temperatura (1). Tais genes foram designados por CDC (do inglês *Cell Division Cycle*). Foram identificados mais de 50 genes CDC's, os quais são necessários em estágios específicos do ciclo de divisão celular. Consistente com seus envolvimento em um processo biológico de importância vital, muitos dos genes CDC's são conservados, tendo funções análogas em vários eucariotos, incluindo humanos.

De forma geral, o processo de divisão celular em *S. cerevisiae* segue a sequência: A - aumento de massa e volume da célula, B - início da síntese de DNA e emergência de um broto na célula, C - divisão nuclear, D - separação das duas células. A figura 1.1 esquematiza o processo de divisão celular. Particularmente os genes CDC3, CDC10, CDC11 e CDC12 revelaram-se importantes para o estágio final (etapa D na figura 1.1) de divisão celular, estando relacionados ao anel de septo, responsável pelo estrangulamento no final da divisão, separando em duas partes o conteúdo citoplasmático (2). Mutações em tais genes geraram células, que a temperatura de 37° C, são incapazes de completar o processo de divisão celular. Os quatro genes são relacionados evolutivamente, definindo uma família de proteínas. Em referência ao anel de septo, utilizou-se o nome septina para definir a família recém identificada. Posteriormente foram identificados mais três genes pertencentes à família em *S. cerevisiae*, os quais foram nomeados por: Shs1, Spr23 e Spr28 (3).

Figura 1.1 – Esquematisação do processo de divisão celular. A seta destaca a formação do anel de septo, responsável pelo estrangulamento final. A - aumento de massa e volume da célula. B - início da síntese de DNA e emergência de um broto na célula. C - divisão nuclear. D - separação das duas células.

Filamentos formando o anel de septo no estágio final de divisão celular em leveduras são mostrados na figura 1.2 (4). O mecanismo pelo qual ocorre a formação do anel ainda não é bem compreendido, contudo, sabe-se que as proteínas CDC3, CDC10, CDC11 e CDC12 são constituintes importantes.

Figura 1.2 – Imagens, obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, do estágio final do processo de divisão celular em levedura. As setas indicam a localização do anel de septo, formado em grande parte por septinas (4). Escala de 0,1 µm (barra preta na parte inferior da imagem).

1.1.2 Septinas em metazoários

Septinas foram inicialmente identificadas em levedura em estágio final de divisão celular, formando filamentos (anel de septo), figura 1.2. Posteriormente, filamentos similares também foram observados em vários eucariotos superiores, com exceção de plantas (5). O primeiro relato de uma septina em metazoário ocorreu em 1994, quando Neufeld e Rubin identificaram em *Drosophila* a proteína Pnut. Eles observaram que a proteína localizava-se no córtex celular durante a interfase e migrava para o sulco de clivagem durante a anáfase (6). Subsequentemente, moléculas homólogas foram encontradas em vários organismos superiores.

Cao, L. et al identificaram e analisaram filogenética e evolutivamente 78 septinas de 9 organismos metazoários: 14 de *Homo sapiens*, 13 de *Mus musculus*, 10 de *Gallus gallus*, 9 de *Xenopus laevis*, 17 de *Danio rario*, 4 de *Strongylocentrotus purpuratus*, 4 de *Ciona intestinalis*, 2 de *Caenorhabditis elegans* e 5 de *Drosophila melanogaster* (7). Baseado na sequência de aminoácidos, as 78 proteínas podem ser divididas em quatro grupos, tabela 1.1. O fato do cordado não vertebrado *Ciona intestinalis* possuir um representante de cada grupo indica que a emergência dos quatro grupos de septinas deve ter ocorrido antes da divergência entre vertebrados e invertebrados. Desta forma, a expansão do número de genes em vertebrados deve ser devido à duplicação de genes pré-existentes.

Dentre todos os organismos que possuem genoma seqüenciado, o nematóide *Caenorhabditis elegans* é o que possui o menor número de septinas, apenas duas, UNC-59 e UNC-61. Desta forma, as duas proteínas de *C. elegans* formam o menor conjunto de septinas de uma mesma espécie, fazendo com que este conjunto tenha grande destaque em estudos estruturais e funcionais de septinas.

Até o momento, existe quatorze genes conhecidos de septinas humanas, alguns dos quais produzem múltiplas cadeias poli-peptídicas através de *splicing* alternativo. Assim, devido ao grande número de proteínas e à variedade de nomes existentes na literatura científica para denominar as septinas identificadas, em 2002 Macara et al propuseram uma nomenclatura padrão para a família (8). Desta forma, adotou-se a nomenclatura padrão em acordo com o Human Genome Organization (HUGO) e o Mouse Genomic Nomenclature (MGN). Para as septinas humanas, acordou-se a nomenclatura *SEPT1-SEPT14* para os genes e SEPT1-SEPT14 para os respectivos produtos gênicos. Para as septinas de camundongo, adotou-se a nomenclatura *Sept1-Sept14* para os genes e SEPT1-SEPT14 para os respectivos

produtos gênicos. Para isoformas, adiciona-se “_v” e o número da isoforma, por exemplo, SEPT9_v1 (septina humana 9 isoforma 1).

Tabela 1.1 – Agrupamento de septinas de metazoários (7).

Organismo	Grupo III	Grupo IV	Grupo II	Grupo I
<i>Homo sapiens</i>	SEPT2-Hs; SEPT4-Hs; SEPT5-Hs; SEPT1-Hs	SEPT7-Hs; SEPT13-Hs	SEPT6-Hs; SEPT8-Hs; SEPT10-Hs; SEPT11-Hs; SEPT14-Hs	SEPT3-Hs; SEPT9-Hs; SEPT12-Hs
<i>Mus musculus</i>	SEPT2-Mm; SEPT4-Mm; SEPT5-Mm; SEPT1-Mm	SEPT7-Mm	SEPT6-Mm; SEPT8-Mm; SEPT10-Mm; SEPT11-Mm; SEPT14-Mm	SEPT3-Mm; SEPT9-Mm; SEPT12-Mm
<i>Gallus gallus</i>	gi:50752104-Gg; gi:57525156-Gg; gi:71897193-Gg	gi:60302768-Gg	gi:71895629-Gg; gi:118090250-Gg; gi:118097603-Gg; gi:118084362-Gg	gi:118082695-Gg; gi:71897123-Gg
<i>Xenopus laevis</i>	gi:52354788-Xl; gi:111598420-Xl	gi:49256249-Xl	gi:504118014-Xl; gi:51703480-Xl; gi:47683059-Xl; gi:68534806-Xl	gi:71679814-Xl; gi:34784614-Xl
<i>Danio rario</i>	gi:115313325-Dr; gi:45709377-Dr; gi:125836845-Dr; gi:82658250-Dr; gi:57524587-Dr; gi:41152396-Dr	gi:115313325-Dr; gi:45709377-Dr; gi:125836845-Dr; gi:82658250-Dr; gi:57524587-Dr; gi:41152396-Dr	gi:47086783-Dr; gi:32822794-Dr; gi:134133316-Dr; gi:62955083-Dr;	gi:66773110-Dr; gi:62122803-Dr; gi:38181410-Dr; gi:125812510-Dr
<i>Ciona intestinalis</i>	gi:198428956-Ci	gi:198436549-Ci	gi:198432765-Ci	gi:198417201-Ci
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	gi:115951499-Sp	gi:115720187-Sp	gi:115770370-Sp	gi:115715387-Sp
<i>Drosophila melanogaster</i>	Sep1-Dm Sep4-Dm	Pnut-Dm	Sep2-Dm, Sep5-Dm	
<i>Caenorhabditis elegans</i>		Unc-61	Unc-59	

1.1.3 Estrutura primária das septinas humanas

Os membros da família de septinas são, genericamente, divididos em três domínios: um domínio N-terminal variável, um domínio central conservado (com atividade GTPásica) e um domínio C-terminal variável, como mostrado esquematicamente na figura 1.3.

Figura 1.3 – Divisão genérica em domínios para as septinas humanas.

O domínio central possui predição de atividade GTPásica e é altamente conservado (com exceção da septina 13 quando comparada com as demais). Pequenas GTPases possuem topologia α/β e, em geral, apresentam cinco motivos, associados a *loops*, com funções específicas para a ligação e hidrólise GTP/GDP, designados por G1-G5 (9). Septinas são caracterizadas pela presença do motivo G1, também conhecido por *P-loop* ou *Walker A box*, o qual é definido pela sequência GXXXXGK[S/T]. Além deste, a maioria das septinas humanas possuem também os motivos G3, caracterizado por DXXG, e G4, caracterizado por XKXD. Em pequenas GTPases, o motivo G1 possui a função de posicionar o nucleotídeo dentro do sítio ativo da proteína (coordenando os fosfatos). Ao passo que o motivo G4 possui a função de reconhecer o anel de guanina do nucleotídeo, proporcionando a especificidade pelo nucleotídeo. A figura 1.3 indica a posição aproximada dos três motivos dentro do domínio GTPase.

Os domínios N- e C-terminal são variáveis, contudo, a maioria das septinas possuem predição de estrutura do tipo *coiled coil* em parte do domínio C-terminal, o que pode estar relacionado com a interação proteína-proteína. O alinhamento das seqüências de aminoácidos das septinas humanas revela uma região poli básica próxima à região do *P-loop* em alguns membros da família, como indicado na figura 1.3. Tal região é relacionada à interação de septinas com membranas, por exemplo, Zhang et al mostraram que SEPT4 é capaz de ligar-se especificamente aos fosfolípidos de membrana contendo fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato [PI(4,5)P2] e fosfatidilinositol (3, 4, 5) trifosfato [PI(3, 4, 5)P3], porém mutações sítio dirigida na região poli básica eliminam tais interações (10).

Como apresentado na seção anterior, baseado na seqüência de aminoácidos, as septinas de metazoários são divididas em quatro grupos, implicando que as 14 septinas humanas são também divididas dentro destes grupos (11). A figura 1.4 representa todas as septinas humanas, divididas nos quatro grupos, dando ênfase nos comprimentos relativos de uma septina para outra dos domínios N- e C-terminal. No caso da septina 13 deve ser notado que o domínio GTPase é maior do que nas demais, sendo que o alinhamento desta com as demais gera vários *gaps* no alinhamento. Desta forma, a septina 13 pode ser considerada como sendo um caso a parte, porém é normalmente classificada dentre do grupo IV, junto com a septina 7.

Figura 1.4 – Representação esquemática de todas as septinas humanas, dando ênfase nos comprimentos relativos de uma septina para outra dos domínios N- e C-terminal (11).

Os integrantes do grupo da septina 3 (Grupo I) são caracterizados por possuírem domínios C-terminal curtos e, contrariamente aos outros três grupos, sem predição teórica de formarem *coiled coil*. Os integrantes do grupo da septina 2 (Grupo III) possuem C-terminais de comprimento mediano, entre 50 e 80 resíduos. Por fim, os integrantes dos grupos das septinas 6 (Grupo II) e 7 (Grupo IV) possuem os domínios C-terminal de maior comprimento, mais de 100 resíduos. As septinas 4 e 9 (não todas as isoformas) são as que possuem os maiores domínios N-terminal, mais de 130 resíduos para SEPT4 e mais de 250 resíduos para SEPT9.

1.1.4 Funções celulares das septinas

Hoje, sabe-se que septinas estão relacionadas com diversos processos celulares, como, por exemplo, citocinese, exocitose, tráfico de vesículas, dinâmica de membrana, dinâmica de

micro-túbulos e segregação cromossômica (12). Contudo, ainda não são totalmente conhecidos os mecanismos de atuação das proteínas em tais processos. Por exemplo, durante o processo de citocinese em *S. cerevisiae*, septinas funcionam como arcabouço para recrutar e “amarrar” os outros componentes do processo, como as proteínas envolvidas na formação do anel contrátil de actina e miosina e do anel de septo na base do broto. A figura 1.5 (13) mostra a localizações das proteínas Myo1p-GFP (uma miosina) e CDC11p (uma septina) na etapa final da divisão celular em levedura, indicando co-localização das duas proteínas durante o processo.

Figura 1.5 – Localizações das proteínas Myo1p-GFP (A e B) e CDC11p (C e D) na etapa final do processo de divisão celular em *S. cerevisiae* (13). As imagens foram realizadas a partir de células na fase de crescimento exponencial em meio YM-P a 25°C (A e C) e após 1h passadas a 37°C (B e D).

Septinas também estão relacionadas ao processo de divisão celular em metazoários. A figura 1.6 mostra a localização dos filamentos de septina em células humanas e de nematóide em processo de divisão celular. Contudo, mutantes de *C. elegans* mostraram que os genes de septinas parecem ser dispensáveis para o processo de citocinese durante a embriogênese. Mas, alterações como extrusão da gônada, defeitos na postura dos ovos, deformidades nos

neurônios sensoriais e na cauda dos machos foram observados na morfogênese pós-embriogênese (14).

Figura 1.6 – Localização dos filamentos de septina em célula em processo de divisão em *Caenorhabditis elegans* (a) e *Homo sapiens* (b). As proteínas de *C. elegans* UNC-59 e UNC-61 foram coradas em vermelho e verde, respectivamente. Para a célula humana corou-se apenas a proteína SEPT9 em verde (15).

Estudos recentes revelaram que septinas também estão associadas com micro-túbulos, proteínas associadas a micro-túbulos e proteínas motores, indicando que a família pode constituir um novo módulo de regulação da função de micro-túbulos (16). A figura 1.7 mostra a co-localização dos filamentos de septina e dos filamentos de micro-túbulos em células MDCK.

Figura 1.7 – Septinas co-localizadas com micro-túbulos (16). (A) e (B) Imagens mostrando septinas (SEPT2, vermelho) e micro-túbulos (α -tubulina, verde) em células MDCK na interfase (A) e na mitose (B). (C) Imagem de microscopia confocal de células MDCK coradas para α -tubulina (verde) e SEPT2 (Vermelho). Barra de escala de 2 μ m.

1.1.5 Septinas em patologias

Em humanos, além de seu papel fisiológico, várias septinas estão relacionadas a casos patológicos, como, por exemplo, câncer, doenças neurodegenerativas e, mais recentemente, invasão bacteriana em células de mamíferos (17). Abaixo apresentamos alguns pontos de destaque.

- A septina SEPT1 é super expressa em células escamosas de carcinoma oral, indicando participação na progressão e/ou proliferação de câncer oral (18);
- A super expressão da proteína humana SEPT9 é observada em vários tipos de tumores (19);
- SEPT4 está relacionada a melanoma maligno e a câncer colorretal (20);
- Em 1998 Kinoshita et al descreveram o acúmulo das septinas 1, 2 e 4 em neurofibrilas e fibrilas gliais da proteína tau presentes em portadores da doença em Alzheimer (21);
- As proteínas SEPT2 e SEPT9 foram associadas à infecção pela bactéria *Listeria monocytogenes*. Sendo a taxa de internalização do patógeno em células de HeLa reduzida quando a taxa de expressão de SEPT2 é reduzida (22);
- Em 2003 Ihara et al, através de exames imunohistoquímicos de tecidos cerebrais de pacientes acometidos pela doença de Parkinson, mostraram a presença da proteína SEPT4 em corpos de inclusão conhecidos como corpos de Lewy (23), figura 1.8.

Figura 1.8 – SEPT4 (corada em vermelho) em corpos de Lewy (ponta das setas). Imagens obtidas a partir de seções cerebrais de pacientes acometidos pela doença de Parkinson (23).

1.1.6 Complexos formados por septinas

Em 1998 Frazier et al purificaram, a partir de células de leveduras, o complexo, com estequiometria 2:2:2:2, formado pelas septinas CDC3, CDC10, CDC11 e CDC12 e mostraram que tal complexo é capaz de formar, *in vitro*, estruturas filamentosas de diâmetro entorno de 7-9 nm e comprimento 30-100 nm (24). Complexos similares também foram purificados a partir de células de metazoários. Em 1996 Field et al isolaram, a partir de células de embriões de *Drosophila*, um complexo formado por três septinas: Pnut (homologa a SEPT7), Sep2 (homologa a SEPT6) e Sep1 (homologa a SEPT2). O complexo foi co-purificado com uma molécula ligada de nucleotídeo de guanina por poli-peptídeo de septina e exibiu atividade GTPásica. Os autores sugeriram que o complexo era formado por um hetero trímero de homo dímeros (25). Em 1998 Hsu et al isolaram, a partir de células de cérebro de mamífero, o complexo formado pelas septinas KIAA0128, CDC10, NEDD5 e H5, cujos nomes atuais são SEPT6, SEPT7, SEPT2 e SEPT4, respectivamente (26). Em 2001 Joberty et al isolaram, a partir de células NIH3T3 de mamífero, o complexo formado pelas septinas 2, 6 e 7 (complexo 2/6/7) (27).

Septinas isoladas a partir de células nativas são sempre encontradas formando complexos com outras septinas. Tentativas de expressão heteróloga em *E. coli* das septinas do complexo 2/6/7 mostraram que as proteínas quando expressas individualmente são instáveis e apresentam forte tendência a agregar, ao passo que a expressão heteróloga simultânea dos três componentes do complexo gera produto estável (28). Tais observações ajudaram a estipular a característica mais marcante da família, a formação de hetero complexos entre septinas.

Em 2003, baseado na compatibilidade da formação de complexos heterólogos de septinas em células de inseto, Makoto Kinoshita lançou a hipótese de que a formação de complexos por septinas esteja ligada à divisão dos membros da família em quatro grupos, figura 1.4 e tabela 1.1 (29). Partindo do complexo 2/6/7, outros complexos podem ser formados de forma que: i) SEPT1, SEPT2, SEPT4 e SEPT5 (grupo III) podem cada uma formar um complexo equimolar com SEPT6 e SEPT7, gerando o complexo X/6/7; onde X = 1, 2, 4 ou 5. ii) SEPT6, no complexo 2/6/7, pode ser substituída por SEPT8, SEPT10, SEPT11 ou SEPT14 (grupo II). iii) SEPT7 (grupo IV) é única e não pode ser substituída por outras. As septinas SEPT3, SEPT9 e SEPT12 (grupo I), as quais possuem domínios C-terminal pequenos, não são consideradas por Kinoshita. Sua proposta tornou-se o paradigma central no estudo dos complexos formados por septinas. Embora a proposta não faça suposição quanto à participação das septinas do grupo I na formação de complexos, pelos menos dois complexos

envolvendo integrantes de tal grupo são conhecidos: o complexo 3/5/7 (30) e o complexo 7/9b/11 (31); onde 9b refere-se a um *splice* alternativo do gene da septina SEPT9.

Dentre todos os complexos de septinas conhecidos o mais bem estudado é o complexo 2/6/7. No ano de 2006 foi proposto, por Low & Macara, o primeiro modelo estrutural para a associação entre as proteínas SEPT2, SEPT6 e SEPT7 em tal complexo (32). No modelo proposto, a formação do complexo e a conseqüente polimerização para a formação de filamentos deve-se primariamente às interações entre os domínios C-terminal. Contudo, o modelo inicial não teve vida longa, no ano seguinte mostrou-se o oposto.

Em Julho de 2007, Sirajuddin et al apresentaram resultados de cristalografia de raios X e microscopia eletrônica do domínio NG (domínio N-terminal mais domínio GTPase) da septina SEPT2 (SEPT2-NG) e do complexo 2/6/7 (33). Os resultados para SEPT2-NG (código PDB 2QA5), com resolução de 3,4 Å, mostraram que no cristal SEPT2-NG forma filamentos através de duas interfaces distintas. A interface 1 (interface G) utiliza a região do sítio de ligação ao nucleotídeo, ao passo que a interface 2 (interface NC) utiliza as regiões N- e C- terminal dos domínios GTPase. A figura 1.9 mostra três subunidades consecutivas de SEPT2-NG, como encontradas no cristal, destacando a presença do nucleotídeo de GDP. Em solução, a construção apresenta-se em equilíbrio monômero/dímero, sendo a proporção de cada espécie dependente da concentração de nucleotídeo, GDP e/ou GTP. Realizando mutações sítio dirigidas nas duas interfaces os autores concluíram que SEPT2-NC dimeriza via interface G.

Figura 1.9 – Três subunidades consecutivas de SEPT2-NG, como encontradas no cristal (33).

Com relação ao complexo 2/6/7, os resultados (código PDB 2QAG), com resolução de 4 Å, mostram que, como no caso anterior, este é capaz de formar filamentos no cristal, sendo que a unidade básica do filamento é um hexâmero formado por duas cópias de cada septina,

consistente com o estado de oligomerização hexamérico observado em solução (a alta concentração salina). Os dados de microscopia eletrônica indicam que as subunidades do complexo associam-se de forma que duas septinas SEPT2 ficam no centro do complexo, enquanto que duas septinas SEPT6 ligam-se, uma de cada lado, às subunidades de SEPT2 e, por fim, duas proteínas SEPT7 ligam-se, também uma de cada lado, ao tetrâmero anterior, formando desta forma uma unidade estrutural composta por seis subunidades. Tais unidades interagem entre si para então formar filamentos (a baixa concentração salina), como indicado de forma esquemática na figura 1.10. Portanto, o hexâmero não é um trímero de homo dímeros, como proposto anteriormente por Field et al (25). Afinal, SEPT6 não interage com ela mesma.

Figura 1.10 – Representação esquemática do complexo das septinas 2/6/7 (33).

É importante notar que todos os domínios GTPase do complexo 2/6/7 estão associados com nucleotídeo, GDP ou GTP, sugerindo que a natureza do nucleotídeo deve influenciar na formação do complexo, como indicado na figura 1.10. Como no caso de SEPT2-NC, a formação do complexo também se dá através de duas interfaces, interface G e interface NC. No complexo 2/6/7, a interação entre as duas subunidades SEPT2 ocorre através da interface NC, a interação entre SEPT2 e SEPT6 ocorre via interface G, a interações entre SEPT6 e SEPT7 ocorre via interface NC e, por fim, a interações entre os hexâmeros, para formar fibras, ocorre através da interface G. A interação via interface G entre subunidades de SEPT7 é sensível a altas concentrações de sal, permitindo o isolamento do complexo em unidades hexaméricas. Deve-se destacar que no complexo a interação de SEPT2 com ela mesma ocorre via interface NC, embora, em solução, SEPT2-GC dimerize via interface G.

Diferentemente do primeiro modelo para o complexo 2/6/7, proposto por Low & Macara, a formação do complexo se dá basicamente através dos domínios GTPase. Na verdade, os domínios C-terminal das septinas, embora presentes nas construções, não apresentam densidade eletrônica, sugerindo que estão desordenados no cristal. Desta forma, a primeira e única estrutura cristalográfica de um complexo de septinas não traz informação a

respeito do papel dos domínios C-terminal. Além destes domínios, vários *loops* e cadeias laterais estão ausentes na estrutura. A figura 1.11 apresenta as sequências de aminoácidos das três septinas, destacando os resíduos “visíveis” (vermelho) na estrutura e os resíduos que definem os domínios C-terminal (sublinhados).

SEPTIN 2

MSKQQPTQFINPETPGYVGFANLPNQVHRKSVKKGFEFTLMVVGESGLGKSTLINSFLTDLYPERVIPGAAEKI
ERTVQIEASTVEIEERGVLRLTVVDTPGYGDAINCRDCFKTIIISYIDEQFERYLHDESGLNRRHIIDNRVHCCF
YFISPFHGHLKPLDVAFMKAIHNKVNIVPIAKADTLTLKERERLKKRILDEIEHNIKIYHLPDAESDEDEDFK
EQTRLKASIPFSVVGSNQLIEAKGKKVRGRLYPWGVVEVENPEHNDFLKLRTMLITHMQDLQEVTDLHYENFR
SERLKRGGGRKVENEDMNKDQILLEKEAELRRMQEMIARMQAQMOMQMGDDGDDGGALGHV

SEPTIN 6

MAATDIARQVGEGRCTVPLAGHVGFDSLDPQLVNKSVSQGFCFNILCVGETGLGKSTLMDTLFNTKFEGETPATHT
QPGVQLQSNLYDLQESNVRLKLTIVSTVGFGDQINKEDSYKPIVEFIDAQFEAYLQEELKIRRVLHTYHDSRIHV
CLYFIAPTGHSLKSLDLVTMKKLDKVNIIPIIAKADAISKSELTKFKIKITSELVSNVQIYQFPTDDESVAEI
NGTMNAHLPPAVIGSTEELKIGNKMMRARQYPWGTQVQVENEHCDFVKLREMLIRVNMEDLREQTHTRHYELRR
CKLEEMGFKDTPDSKPFSLQETYEAKRNEFLGELQKKEEMRQMFVQRVKEKEAELKEAEKELHEKFDRLKKLH
QDEKKKLEDKKKSLDDEVNAFKQRKTAELLQSQGSQAGGSQTLKRDKEKKN

SEPTIN 7

MVAQQKNLEGYVGFANLPNQVYRKSVKRGFEFTLMVVGESGLGKSTLINSFLTDLYSPEYPGPSHRIKKTQVQE
QSKVLIKEGGVQLLLTIVDTPGFGDAVDNSNCWQPVIDYIDSKFEDYLNESRVNRRQMPDNRVQCCLYFIAPSG
HGLKPLDIEFMKRLHEKVNIIPLIAKADTLTPEECQQFKQIMKEIQEHKIKIYEFPETDDEENKLVKKIKDRL
PLAVVGSNTIIEVNGKVRGRQYPWGVAEVENGEHCDFTLRNMLIRTHMQDLKDVNTNVHYENYRSRKLAAVY
NGVDNKNKGQLTKSPLAQMEERREHVAKMKMEMEQVFEMKVKEKVQKLKDSEALQRRHEQMKNLEAQH
KELEEKRRQFEDEKANWEAQQRILEQQNSSRTLEKNKKKGKIF

Figura 1.11 – Estrutura primária das septinas do complexo 2/6/7. Os resíduos marcados em vermelho são “visíveis” na estrutura do complexo. Os resíduos sublinhados definem os domínios C-terminal (33).

Até o momento, a falta de detalhes moleculares representa um gargalo no progresso da compreensão dos mecanismos de ação das septinas de um modo geral. Embora o trabalho de Sirajuddin et al tenham causado uma revolução no estudo do complexo 2/6/7, as estruturas obtidas não possuem resolução suficiente para sua completa elucidação. Muitos detalhes da estrutura, como alguns *loops* de superfície e orientações de muitas cadeias laterais, ainda não estão definidos, figura 1.11.

Os autores também mostraram que os domínios C-terminal são dispensáveis para a formação do complexo. Assim, aliado ao fato da desordem dos domínios no cristal, a função de tais partes permanece obscura. Contudo, as orientações das hélices finais dos domínios GTPase, figura 1.10, sugerem fortemente que os domínios C-terminal “saem” lateralmente, numa direção aproximadamente perpendicular ao eixo do filamento, indicando que os domínios C-terminal das duas subunidades SEPT2 interagiriam formando um *coiled coil* homo diméricos, enquanto que os domínios C-terminal das subunidades SEPT6 e SEPT7 formariam um *coiled coil* hetero diméricos. Tal hipótese está coerente com o comprimento

relativo dos domínios C-terminal nestas septinas, mas, ainda carece de comprovação experimental.

No mesmo ano (2007), Rabeh et al depositaram no PDB (*Protein Data Bank*) a terceira estrutura cristalográfica (com resolução de 2,60 Å) de um domínio de septina, o domínio GTPase da septina SEPT2, complexado com GDP, SEPT2-G (código PDB 2QNR). O trabalho completo referente a esta nova estrutura ainda não foi publicado, todavia, observa-se que SEPT2-G forma filamentos no cristal, seguindo as duas mesmas interfaces observadas para SEPT2-NG. A figura 1.12(A) mostra o alinhamento estrutural dos dímeros das duas estruturas de construções de SEPT2, complexadas com GDP, sendo que o alinhamento foi realizado baseado apenas na primeira cadeia de cada dímero (as cadeias da esquerda). Nota-se o excelente alinhamento para ambas as cadeias.

Figura 1.12 – Alinhamentos estruturais. (A) SEPT2-NG (amarelo) e SEPT2-G (verde). (B) SEPT2-G β (azul) e SEPT2-G (Verde). Ambos os alinhamentos forma realizados com base apenas na primeira cadeia de cada dímero (as cadeias da esquerda). Em (A) ambos os domínios estão complexados com GDP e em (B) SEPT2-G β (azul) está complexado com GppNHp e SEPT2-G com GDP (verde).

Em 2009 Sirajuddin et al (34) apresentaram a quarta e última (por enquanto) estrutura cristalográfica (com resolução de 2,90 Å) de uma construção de septina publicada no PDB, o domínio GTPase da septina 2, complexado com GppNHp (análogo de hidrólise lenta do GTP), o qual chamaremos de SEPT2-G β (código PDB 3FTQ), visto que sua estrutura primária não é exatamente a mesma que para SEPT2-G (código PDB 2QNR). Contrariamente às duas estruturas anteriores de construções de SEPT2, SEPT2-G β não forma filamentos no cristal. Neste caso, a unidade assimétrica é constituída por quatro cadeias polipeptídicas, dois dímeros, sendo a interface G usada para a dimerização. A figura 1.12(B) mostra o alinhamento estrutural do dímero de SEPT2-G com um dos dois dímeros da unidade assimétrica de SEPT2-G β , sendo que o alinhamento foi realizado baseado apenas na primeira cadeia de cada dímero (as cadeias da esquerda). É importante notar o deslocamento posicional dos elementos de estrutura secundária das segundas cadeias (as cadeias da direita).

Desta forma, observa-se que a natureza do nucleotídeo influencia na orientação relativa das duas cadeias.

Embora apenas o complexo 2/6/7 possua estrutura cristalográfica, devido a estudos estruturais recentes, outros dois complexos merecem comentário a parte. John et al mostraram que as proteínas UNC-59 e UNC-61 de *C. elegans* (as únicas septinas codificadas pelo seu genoma) formam um complexo tetramérico (complexo 59/61) composto por duas cópias de cada septina (a alta concentração de sal), sendo o complexo capaz de formar filamentos a baixa concentração salina (35). As proteínas UNC-59 e UNC-61 são homologas a SEPT6 e SEPT7, respectivamente. Baseado em dados de microscopia eletrônica, os autores propuseram que as unidades tetraméricas polimerizam via interações entre as subunidades UNC-59 para formar filamentos. Estudos de dicroísmo circular, FRET, centrifugação analítica e desenovelamento térmico mostraram que os domínios C-terminal de UNC-59 e UNC-61 formam um *coiled coil* hetero diméricos e que estes domínios “saem” lateralmente, numa direção aproximadamente perpendicular ao eixo longitudinal do complexo, figura 1.13. Tal modelo é coerente com a estrutura cristalográfica do complexo 2/6/7, figura 1.10. Como no caso de septinas de mamíferos, não existe nenhuma estrutura detalhada da região C-terminal das septinas de *C. elegans*.

Figura 1.13 – Dois modelos propostos para o complexo formado pelas proteínas UNC-59 (verde) e UNC-61 (vermelho) (35).

O outro complexo a apresentar estudos estruturais significativos recentes é o formado pelas septinas CDC3, CDC10, CDC11 e CDC12 de *S. cerevisiae* (o complexo inicial, o qual

foi utilizado para definir a família das septinas) (36). Dados de microscopia eletrônica confirmaram que o hetero oligômero é linear, sendo composto por oito septinas, duas cópias de cada. Os autores mostraram que as proteínas no complexo seguem a ordem CDC11-CDC12-CDC3-CDC10-CDC10-CDC3-CDC12-CDC11 e observaram que o complexo é capaz de formar filamentos simples e, em alguns casos, filamentos duplos. A figura 1.14 apresenta o modelo proposto para a formação de filamentos simples e duplos. Neste caso, os domínios C-terminal desempenhariam a função de ligação cruzada entre filamentos.

Figura 1.14 – Modelo proposto para a formação de filamentos simples e duplos pelas septinas CDC3, CDC10, CDC11 e CDC12 de *S. cerevisiae* (36).

1.2 Coiled coils

Por definição, um *coiled coil* é um feixe de estruturas secundárias do tipo α -hélice, onde as hélices estão enroscadas umas sobre as outras, gerando uma super-hélice (37). Os mais comuns são oligômeros compostos por apenas duas ou três hélices. Tal estrutura foi proposta pela primeira vez, em 1952, por Crick como sendo a estrutura para a proteína fibrosa α -keratina (38). É interessante observar que tal conjectura foi formulada apenas um ano após Pauling, Corey e Branson terem propostos a estrutura α -hélice (39). Crick propôs que as hélices constituintes enroscavam-se entre si de forma a gerarem uma superfície de contato hidrofóbica, mantendo um empacotamento para as cadeias laterais conhecido como *knobs-into-holes*. Ele imaginou que cada resíduo da região central de uma hélice (*knob*) encaixaria no espaço formado por quatro resíduos próximos na outra hélice (*hole*), figura 1.15.

Figura 1.15 – Empacotamento *Knobs-into-holes* para duas α -hélices.

Estruturas secundárias do tipo hélice possuem valores característicos do número de resíduos por volta. Ao enroscar duas ou mais hélices formando uma super-hélice de mão esquerda há uma diminuição no número de resíduos por volta. Por outro lado, ao enroscar de modo a gerar uma super-hélice de mão direita há um aumento. Hélices do tipo α -hélice possuem 3,6 resíduos por volta, contudo, em *coiled coils* canônicos, como proposto por Crick, este valor cai para 3,5, indicando que estes são super-hélices de mão esquerda.

O ponto mais característico de *coiled coils* está no fato de que para manter o contato hidrofóbico entre as hélices, é necessário que haja certa periodicidade na sequência primária. O valor de 3,5 resíduos por volta sugere periodicidade mínima de sete resíduos (repetição

heptamérica), ou duas voltas da hélice. É comum referirmos às sete posições repetitivas por a, b, c, d, e, f e g, sendo que a fase de tal nomeação é tomada de forma que os resíduos centrais estejam nas posições a e d. Em muitos *coiled coils* os resíduos nas posições e e g aparecem formando interações eletrostáticas, aumentando a estabilidade da estrutura. A figura 1.16 mostra a representação em roda das duas α -hélices de um *coiled coil* dimérico e paralelo.

Figura 1.16 – Representação em roda das duas hélices de um *coiled coil* dimérico e paralelo.

Embora, como proposto inicialmente por Crick, a região de contato entre as hélices seja estabilizada primariamente por interações hidrofóbicas, é comum a ocorrência de aminoácidos polares ou carregados nas posições a e d, estima-se 25% (40). Sendo mais freqüentes em *coiled coils* diméricos do que em triméricos, possivelmente por serem menos expostos ao solvente em trímeros do que em dímeros.

Vinte anos após a proposta de Crick, obteve-se o sequenciamento do primeiro domínio do tipo *coiled coil*, o domínio C-terminal da proteína tropomiosina (41). Este trabalho comprovou de forma direta o conceito de repetições sete a sete de um padrão de resíduos hidrofóbicos. Embora também seja observada a presença de resíduos hidrofílicos nas posições a e d, o ponto principal é que a ocorrência de alguns resíduos hidrofílicos não causa ruptura no padrão geral de repetições de resíduos hidrofóbicos. No caso da tropomiosina, este padrão é claramente reconhecido por mais de cem resíduos. A figura 1.17 apresenta o resultado do sequenciamento obtido para as duas cadeias de tropomiosina, os resíduos nas posições centrais, a e d, são destacados por retângulos e elipses, respectivamente. Em vermelho são destacados três resíduos hidrofílicos, os quais ocupam posições centrais.

Figura 1.17 – Sequenciamento obtido para as duas cadeias de tropomiosina (41). Os resíduos nas posições centrais, a e d, são destacados por retângulos e elipses, respectivamente. Em vermelho são destacados três resíduos hidrofílicos, os quais ocupam posições centrais.

No entanto, contrariamente à tropomiosina, quase todas as proteínas α -fibrosas apresentam descontinuidades de fase heptamérica ou são muito menores em comprimento (42). Na maior parte dos casos, as descontinuidades são muito conservadas, indicando seus significados estruturais e funcionais. Tais descontinuidades podem ser representadas por inserções de um ou mais resíduos na sequência heptamérica. Inserções de um, três e quatro resíduos são chamadas *skips*, *stammers* e *stutters*, respectivamente. Outras inserções podem ocorrer, mas, não são frequentes o bastante para serem nomeadas.

Inserções podem ser acomodadas estruturalmente por perturbações na continuidade da cadeia polipeptídica ou no empacotamento das cadeias laterais. Inserções de três ou quatro resíduos estão próximas de uma volta completa de uma hélice em *coiled coil* (3,5 resíduos por volta), o que permite sua acomodação pela estrutura hélice, distorcendo basicamente o número de resíduos por volta e as interações *knobs-into-holes* no interior. Inserções de 4 resíduos, *stutters*, causam aumento na periodicidade local, causando um desenrolamento da super-hélice de mão esquerda; *stammers* causam efeito contrário. Outras inserções não podem ser acomodadas sem alterações locais na estrutura da hélice. Sempre que possível, a acomodação é feita preservando-se o padrão de ligações de hidrogênio e o empacotamento *knobs-into-holes* das hélices e então abrindo uma quebra na hélice para que os resíduos extras sejam acomodados por um *loop* na sequência da hélice, *looping out*. Por exemplo, o *skip* na

proteína GreA (PDB: 1GRJ) é acomodado estruturalmente por uma dobra em uma das hélices, figura 1.18.

Figura 1.18 – O *skip* na proteína GreA (PDB: 1GRJ) é acomodado estruturalmente por uma dobra em uma das hélices.

Outra definição comumente utilizada é o chamado zíper de leucinas, que nada mais é do que um *coiled coil* com leucinas nas posições d. A proteína GCN4 é um ativador de transcrição e está envolvida na biosíntese de aminoácidos em leveduras. Tal proteína possui um domínio de ligação a DNA e um domínio zíper de leucinas, responsável pela dimerização, figura 1.19(A). O domínio zíper de leucinas de GCN4 (33 resíduos) é comumente designado por GCN4-p1 e constitui o protótipo para estudos estruturais em *coiled coils*. Convém destacar que *coiled coils* são comumente usados como motivos de oligomerização.

Em 1991 O'Shea et al resolveram a estrutura de GCN4-p1, com resolução de 1,8Å (43). Na figura 1.19(B) é mostrada a sequência de aminoácidos da construção, junto com a fase do *coiled coil*. É importante notar que a asparagina 16 (destacada em vermelho) ocupa a posição a da terceira repetição heptamérica, ou seja, um resíduo polar ocupando uma das posições centrais. Da estrutura cristalográfica (código PDB 2ZTA), percebe-se o empacotamento *knobs-into-holes* para a região central, como proposto por Crick, e interações eletrostáticas entre alguns pares de resíduos e e g. No cristal, são vistos os primeiros 31 dos 33 resíduos, sendo que destes 30 estão em conformação α . Dos resíduos “visíveis” apenas a glicina 31 não está em conformação α .

Figura 1.19 – (A) Representação dos domínios zíper de leucinas e de ligação à DNA em GCN4. (B) sequência primária do peptídeo GCN4-p1, junto com a descrição da fase do *coiled coil*.

Com o intuito de estudar a influência de diferentes resíduos hidrofóbicos na estabilidade e no estado de oligomerização de *coiled coils*, Harbury et al realizaram mudanças sistemáticas no peptídeo GCN4-p1 (44). Eles mudaram simultaneamente quatro resíduos a (V9, N16, V23 e V30) e quatro resíduos d (L5, L12, L19 e L26) para leucina, valina ou isoleucina. Convém destacar que leucina possui bifurcação no carbono γ e que os outros dois resíduos possuem bifurcação no carbono β . Estes peptídeos foram nomeados por GCN4-pxy, onde x indica o resíduo das quatro posições a e y o resíduo das quatro posições d. Para o estado de oligomerização, obteve-se que GCN4-pIL é dímero paralelo, GCN4-pII é trímero paralelo, GCN4-pLI é tetrâmero, também paralelo, e que os demais, GCN4-pVI, GCN4-pVL, GCN4-pLV e GCN4-pLL, apresentam múltiplos estados de oligomerização.

Todas as construções acima apresentaram maior estabilidade térmica do que o peptídeo original. Por exemplo, GCN4-pVL, que diferencia-se de GCN4-p1 por apenas uma mutação (N16V), possui T_m de 95°C enquanto que a construção original possui T_m de 53°C. Contudo, GCN4-p1 possui estado de oligomerização definido (dímero) ao passo que GCN4-pVL apresenta-se como mistura entre dímeros e trímeros. Desta forma, vemos que a presença de apenas um resíduo polar (N16) na região central foi capaz de gerar especificidade quanto ao estado de oligomerização. Os resultados de Harbury et al também indicam que: resíduos com bifurcação β nas posições d desfavorecem dímeros, nas posições a desfavorecem tetrâmeros e em ambas as posições facilita a formação de trímeros. Por fim, leucinas (bifurcação γ) nas posições d e resíduos com bifurcação β nas posições a favorecem a formação de dímeros.

Em outro trabalho, Gonzalez et al fizeram substituições no resíduo N16, trocando-o por glutanina, lisina e norleucina (lisina sem o grupo amino, Nlr) (45). Eles observaram que GCN4-p1-N16K forma dímeros, com o grupo amino voltado para o solvente e

empacotamento central menos compacto. GCN4-p1-N16Nrl forma dímeros e trímeros; da estrutura cristalográfica da forma dimérica, vê-se um empacotamento mais compacto para a cadeia lateral de Nrl16. Por fim, GCN4-p1-N16Q forma dímeros e trímeros, obtendo-se cristais para ambas as formas. Os cristais para a forma dimérica cresceram a 4°C, enquanto que os cristais para forma trimérica cresceram a temperatura ambiente. Para os primeiros, as cadeias laterais das glutaminas estão estendidas, observando-se a presença de uma molécula de água no interior. Para os segundos, as cadeias laterais das glutaminas estão mais escondidas do solvente e observam-se duas moléculas de água. Em suma, resíduos polares não necessariamente favorecem dímeros, mas, desempenham papel importante na seletividade. Convém destacar que N16 e N16K favorecem dímeros, mas, por mecanismos diferentes, K16 é melhor solvatada e N16 pode formar ligações de hidrogênio na interface de dimerização.

Capítulo 2

Objetivos

Somewhere, something incredible is waiting to be known.

Carl Sagan

Capítulo 2 Objetivos

Septinas constituem uma conservada família de proteínas GTPases de citoesqueleto. Os membros de tal família estão envolvidos em vários processos celulares essenciais, como citocinese, o ciclo celular, formação de barreiras de difusão e exocitose, além de estarem relacionados a quadros patológicos, como doenças neurodegenerativas e cânceres. A principal característica da família está na capacidade de seus membros formarem filamentos compostos por septinas diferentes. Contudo, os mecanismos moleculares e bioquímicos do funcionamento de tais proteínas ainda são pouco conhecidos, principalmente os relacionados à formação de complexos.

Há alguns anos atrás, o grupo de cristalografia do IFSC/USP criou um sub-grupo, o qual chamaremos de grupo dos septinólogos, que se dedicaria ao estudo de septinas humanas. As principais propostas do grupo dos septinólogos foram: a caracterização bioquímica e estrutural de todas (ou quase todas) as septinas humanas e estudos dos possíveis complexos formado entre elas.

A primeira septina a ser estudada no grupo foi SEPT4, cuja caracterização foi realizada durante o doutoramento de Wânius José Garcia da Silva (46). Recentemente, o então aluno de doutorado Fernando Alessandro resolveu a estrutura (à resolução de 3,4 Å) do domínio NG (domínio N-terminal mais domínio GTPase) da proteína SEPT7 (SEPT7-NG) (47), mostrando que SEPT7-NG forma filamentos no cristal, seguindo as duas mesmas interfaces observadas até então. Tais resultados são mais uma evidência da importância dos dois tipos de interface para a formação de complexos de septinas.

Dada a inexistência de informações estruturais a nível atômico para os domínios C-terminal de septinas humanas, a baixa qualidade das poucas estruturas cristalográficas existentes de domínios GTPases e a proposta do grupo dos septinólogos, os objetivos gerais do presente trabalho foram:

- A obtenção de informações bioquímicas e estruturais dos domínios C-terminal de septinas humanas, com destaque para os domínios das septinas envolvidas no complexo 2/6/7;

- A obtenção da estrutura cristalográfica da construção SEPT3-GC (domínio GTPase mais domínio C-terminal) da proteína SEPT3.

Os domínios C-terminal serão clonados e expressos heterologicamente em *E. coli* e purificados durante a realização do trabalho. Para os estudos bioquímicos e estruturais utilizaremos as técnicas: filtração em gel, *cross-linking* químico, espectroscopia de dicroísmo circular, ressonância plasmônica de superfície, ultracentrifugação analítica, cristalografia de raios-X, ressonância magnética nuclear e análises *in silico*.

A proteína SEPT3 foi caracterizada durante o doutoramento de Joci Neuby Alves Macedo (48), sendo que a única construção estável o suficiente para a realização de ensaios de cristalização foi SEPT3-GC. Vale ressaltar que SEPT3 pertence ao único grupo de septinas humanas que possuem a predição de não apresentarem *coiled coil* no domínio C-terminal (Grupo I, figura 1.4). Tal grupo é o único para o qual não existe nenhuma estrutura cristalográfica. Com o objetivo de obtermos a estrutura cristalográfica de SEPT3-GC, realizaremos ensaios de cristalização e, em caso positivo, coletaremos dados de difração de raios-X, para a resolução de sua estrutura.

Capítulo 3

Metodologia

Science is a way of trying not to fool yourself. The first principle is that you must not fool yourself, and you are the easiest person to fool.

Richard Feynman

Capítulo 3 Metodologia

Neste capítulo apresentamos as metodologias utilizadas para o estudo dos domínios C-terminal das septinas humanas, assim como para a cristalização e resolução estrutural da construção SEPT3-GC. O capítulo de metodologia foi escrito de forma a conter informações de caráter técnico, servindo como suporte técnico para o capítulo de resultados e discussões, o qual é, em termos de entendimento geral do trabalho, independente, na medida do possível, do capítulo de metodologia.

3.1 Subclonagens

Todos os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados nas amplificações dos respectivos cDNAs foram sintetizados pela empresa Prodimol Biotecnologia, sendo todos planejados para gerarem insertos compatíveis com o vetor pET28a(+) (Novagen). A figura 3.1 mostra os *primers* adquiridos para as subclonagens das cinco construções utilizadas. Para os domínios SEPT2-C e SEPT6-C incluiu-se um códon extra para codificar para um triptofano no início do domínio, para que as construções sejam “visíveis” na região ultravioleta.

SEPT2-C	F-Nde	5´ AGCATATGTGGGGCAGGAAAGTGGAGAATGAG
SEPT2-C	R-BamHI	5´ AGGGATCCTTACACGTGGTGCCCGAGAG
SEPT6-C	F-Nhe	5´ AGGCTAGCTGGGGCTTCAAGGACACCGAC
SEPT6-C	R-Not	5´ AGGCGGCCGCTTAATTTTCTTCTCTTTGTC
SEPT7-C	F-Nde	5´ AGCATATGACTTATAATGGAGTTGATAACAACAAG
SEPT7-C	R-BamHI	5´ AGGGATCCTTAAAAGATCTTCCCTTTCTTCTTGTTTC
SEPT6-CC	F-Nde	5´ ACATATGGTCCAGCGAGTCAAAGAGAAAGAAG
SEPT6-CC	R-BamHI	5´ AGGGATCCTTACAGCTCAGCCGCCGTCT
SEPT7-CC	F-Nde	5´ ACATATGGAGATGAAGGTCAAAGAAAAAGTTC
SEPT7-CC	R-BamHI	5´ AGGGATCCTTATTGTTCTAAAATACGTTGTTGAGC

Figura 3.1 – Oligonucleotídeos utilizados. Em verde são marcados os sítios de restrição e em amarelo os códons extras que codificam para triptofano.

Os fragmentos de cDNA foram amplificados pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando como molde inicial os cDNAs das proteínas inteiras previamente clonados em nosso grupo de pesquisa por meio da reação mostrada na tabela 3.1, com o uso

do *mix* “High Fidelity PCR Enzyme Mix” (Fermentas), o qual produz fragmentos com um nucleotídeo de adenina extra na extremidade 3'. Para as reações de PCR utilizou-se o termociclador “Mastercycler Gradient” (Eppendorf), com as condições de temperatura e tempo mostradas na tabela 3.2. Após um período de 2 minutos a 94 °C, uma série de 35 repetições a temperatura e tempo dados pela tabela 3.2 são executadas e, por fim, mantém-se a amostra a 72 °C por 5 minutos. Os ciclos de PCR foram os mesmos para todas as construções, alterando-se apenas a temperatura de anelamento.

Tabela 3.1 – Reação para a amplificação por PCR.

Reagente	Volume
Tampão de PCR 10X (Fermentas)	5 µl
Oligonucleotídeo F (100 pmol/µl)	1 µl
Oligonucleotídeo R (100 pmol/µl)	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
DNA molde (~100ng/µl)	1 µl
Taq DNA Polimerase (High Fidelity)	0,5 µl
H ₂ O	35,5 µl
Volume Final	50 µl

Tabela 3.2 – Ciclo de PCR para as reações de amplificação para as construções. O ciclo foi o mesmo para as cinco construções, com alterações apenas na temperatura de anelamento, como mostrado em destaque (vermelho). As temperaturas são dadas em Celsius.

Ciclo	<u>1X (°C)</u>	<u>35X (°C)</u>			<u>1X (°C)</u>
SEPT2-C	94	94	60	72	72
SEPT6-C	94	94	58	72	72
SEPT7-C	94	94	55	72	72
SEPT6-CC	94	94	62	72	72
SEPT7-CC	94	94	57	72	72
Tempo	2 min.	30 seg.	30 seg.	2 min.	5 min.

Após as reações de amplificação, aplicamos as amostras em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml), sob iluminação ultravioleta. Os fragmentos amplificados foram purificados a partir do gel utilizando-se o kit de purificação de DNA “Wizard SV Gel and PCR Clean-up System” (Promega). Os produtos gênicos foram então clonados no vetor de propagação “TOPO TA Cloning” (Invitrogen), que permite sua ligação direta, “clonagem T-A”, ao produto de PCR, facilitando a reação de ligação. Para essas reações foram utilizados: 1,0 µl de inserto (~50 ng/µl), 1,0 µl do vetor (10 ng/µl), 1,0 µl solução salina para o vetor “TOPO TA Cloning” e 3,0 µl H₂O, com incubação por 30 minutos à temperatura de 4 °C.

Os recombinantes, resultantes das reações de ligação dos insertos no vetor “TOPO TA Cloning”, foram transformados em bactéria *E. coli* DH5 α , competentes por tratamento com cloreto de cálcio. Para as reações de transformação, adicionou-se 1 µl da reação de ligação a 100 µl de solução de bactérias competentes, incubando em gelo por 30 minutos. Em seguida, a solução foi submetida à incubação em banho-maria por 2 minutos a 42 °C, seguido por banho em gelo por 1 minuto (choque térmico). Adicionamos 0,2 ml de meio LB (Luria-Bertani) à solução e então incubamos por 1 hora a 37 °C, sob agitação. Após esse período, plaqueamos a cultura em meio seletivo, Agar LB com canamicina (50 µg/ml), e incubamos por 24 horas a 37 °C.

O vetor “TOPO TA Cloning” possui o gene que codifica para a proteína β -galactosidase. Assim, o controle para a inserção do gene de interesse pode ser realizado utilizando-se X-Gal. Desta forma, adicionamos também X-Gal (100 µg/ml) e IPTG (0,2 mM) à placa de Agar LB. Com isso, as colônias que não possuem o inserto ficam azuis, enquanto que as colônias com o inserto ficam brancas.

Algumas colônias positivas (brancas) foram pré-inoculadas em 5 ml de meio LB seletivo (50 µg/ml de canamicina). Após o meio atingir DO₆₀₀ em torno de 0,6, a cultura foi submetida a uma reação de lise e extração dos DNAs plasmidiais. Nesta etapa, utilizamos o kit de extração de DNA plasmidial, “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega). Realizamos o procedimento de seqüenciamento automático utilizando o primer universal M13. Para cada construção, selecionamos uma amostra com sequência e fase de leitura corretas para a realização das reações de digestão com as enzimas de restrição apropriadas (figura 3.1), em seus respectivos tampões. Cada reação foi realizada em um volume de 10 µl, por 1 hora a 37 °C.

Após as reações de digestão, as amostras foram aplicadas em géis de agarose (0,8%) corados com brometo de etídeo (0,5 µg/ml), os insertos foram purificados a partir do gel utilizando-se o kit de purificação de DNA “Wizard SV Gel and PCR Clean-up System” (Promega). Em paralelo, o vetor de expressão pET28a(+) também foi digerido (linearizado) com as mesmas enzimas, sendo também aplicado em gel de agarose e purificado a partir do gel.

Por fim, os insertos digeridos e os vetores linearizados foram ligados com a enzima T4 DNA ligase (Fermentas). Para as reações de ligação utilizou-se: 1 µl de T4 DNA Ligase (1U), 150 ng dos fragmentos de inserto, 30 ng do DNA linearizado, tampão de ligação (Fermentas) e H₂O, com um volume final de 10 µl. As soluções foram incubadas por cerca de 30 horas à temperatura de 4 °C. Após esse período, 3 µl de cada solução foram utilizados para transformar células de *E. coli DH5α*, competentes por tratamento com cloreto de cálcio. Para cada construção algumas colônia foram pré-inoculada em 5 ml de meio LB seletivo (50 µl/ml de canamicina). Sendo os DNAs plasmidiais extraídos como descrito acima. Para testar se os insertos haviam sido inseridos nos vetores, realizamos PCR utilizando os plasmídeos recém extraídos como molde, como descrito no início da seção. Para cada construção, selecionamos apenas uma das amostras positivas (amostras que produziram amplificadas de PCR de tamanho esperado) e armazenamos a -80 °C para subsequente utilização.

Os vetores pET28a(+) contendo os insertos para as construções SEPT2-C, SEPT6-C, SEPT7-C, SEPT6-CC e SEPT7-CC foram nomeados por pET28a-SEPT2-C, pET28a-SEPT6-C, pET28a-SEPT7-C, pET28a-SEPT6-CC e pET28a-SEPT7-CC, respectivamente.

3.2 Expressão e purificação dos domínios C-terminal das septinas do complexo 2/6/7

Células de *E. coli*, competentes por tratamento com cloreto de cálcio, foram transformadas com os plasmídeos descritos na seção anterior. Para as expressões dos domínios SEPT2-C, SEPT6-C e SEPT7-C utilizamos a cepa BL21(DE3). Para os domínios SEPT6-CC e SEPT7-CC utilizamos a cepa Rosetta(DE3). Em todos os casos, alíquotas de amostras contendo os recombinantes foram pré-inoculadas à temperatura de 37 °C, *over night* e sob agitação (250 rpm) em 5 ml de meio LB seletivo. Para a cepa BL21(DE3) o antibiótico

utilizado foi canamicina (50 µl/ml), para as cepas Rosetta(DE3) e BL21-CodonPlus(DE3) utilizamos dois antibióticos simultaneamente, canamicina (50 µl/ml) e cloranfenicol (34 µl/ml).

Os 5 ml de pré-inóculo foram transferidos para 500 ml de LB seletivo (frasco de 2 litros) e incubado a 37 °C sob agitação até atingir $DO_{600} = 0,7$. Neste momento, a temperatura do *shaker* foi reduzida para 18 °C e, após 30 minutos, o indutor IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) foi adicionado à cultura para concentração final de 0,2 mM e a incubação prosseguiu *over night* nas mesmas condições para promover a expressão.

Após o período de indução, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 6.000g e 4 °C. Ressuspendemos as células em 20 ml – 40 ml do tampão de lise (cuja composição é descrita, caso a caso, no capítulo 4). O processo de lise se deu com pulsos de ultrassom (sonicação) para romper as células. Essa etapa foi realizada em gelo com 10 ciclos de 20 segundos, com intervalo de 10 segundos entre os pulsos, com potência de 11% no equipamento *Sonic Dismembrator*, Modelo 500 (Fisher Scientific). Após o processo de lise centrifugamos as amostras por 20 minutos a 20.000g à temperatura de 4 °C. Os sobrenadantes foram então aplicados em coluna de afinidade de níquel, *Nickel-nitrilotriacetic acid* (Ni-NTA) (GE Healthcare), previamente equilibrada com o tampão de lise. A lavagem da coluna se deu através da passagem de lise com gradiente crescente da concentração de imidazol: 25 ml com 10 mM de imidazol, 25 ml com 30 mM de imidazol, 25 ml com 50 mM de imidazol. A primeira parte de todas as purificações foi idêntica.

Para a construção SEPT7-C, após a cromatografia de afinidade, utilizamos cromatografia de troca iônica (troca catiônica), realizada em um sistema ÄKTA HPLC, em coluna Mono STM HT (GE Healthcare). Neste caso, a amostra foi eluída da coluna de afinidade de níquel (primeira etapa) em tampão 20 mM Tris, 150 mM Imidazol, 200 mM NaCl e pH 7,5, num volume de 40 ml. O volume de amostra aplicada na coluna foi de 10 ml por corrida, com fluxo de 1 ml/min. Para cada corrida, a amostra era eluída em volume de 2 ml, de forma que os 40 ml iniciais foram concentrados para 8 ml no processo de troca iônica. Após a coluna de troca iônica, adicionamos trombina protease para a clivagem da cauda. Por fim, a amostra foi novamente aplicada em coluna de afinidade de níquel, com 30 mM de imidazol, seguida por aplicação em coluna de benzamidina sefarose (GE Healthcare), para retirada do *His-tag* clivado (e proteínas não clivadas) e da trombina protease, respectivamente, e posta para dialisar contra o tampão final de trabalho.

Para as demais construções, após a cromatografia de afinidade, dialisamos as amostras contra o tampão de lise (para a retirada do imidazol) e adicionamos trombina protease para a clivagem da cauda. Como no caso de SEPT7-C, a amostra foi novamente aplicada em coluna de afinidade de níquel, com 30 mM de imidazol, seguida por aplicação em coluna de benzamidina sefarose, para retirada do *His-tag* clivado (e proteínas não clivadas) e da trombina protease, respectivamente, e posta para dialisar contra o tampão final de trabalho. Todas as reações de clivagem dos *His-tags* foram realizadas *over night*, em gelo e utilizando 2 unidades de trombina protease (Amersham Biosciences, 27-0846-01) por ml de solução.

3.3 Filtração em gel e *cross-linking* químico

Para as duas técnicas utilizamos o tampão 20 mM de Fosfato de Potássio, 50 mM NaCl e pH 7,5. As filtrações em gel, ou SEC (do inglês *Size Exclusion Chromatography*), foram realizadas em um sistema ÄKTA HPLC, usando coluna de exclusão por peso molecular Superdex 75 (HR 10/300 GL, GE Healthcare), previamente equilibrada com tampão. As amostras foram injetadas e os respectivos volumes de eluição comparados àqueles de massa molecular padrão, disponíveis no kit “*Gel Filtration Calibration Kits*” (GE Healthcare). Os padrões utilizados foram 1 mg/ml de aprotinina (6.500 Da), 1 mg/ml de ribonuclease A (13.700 Da), 1 mg/ml de anidrase carbônica (29.000 Da), 1 mg/ml de ovalbumina (43.000 Da) e 1 mg/ml de conalbumina (75.000 Da). O Blue Dextran 2000 (1 mg/mL) foi utilizado como padrão para determinar o volume de exclusão da coluna. Os padrões também foram preparados no tampão descrito acima. As cromatografias foram realizadas sob fluxo constante de 0,5 ml/min., com volume de amostra aplicada de 0,5 ml. Os volumes relativos de eluição foram calculados por: $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_c - V_e)$, onde V_e é o volume de eluição, V_0 é o volume de *void* e V_c é o volume geométrico da coluna. A curva padrão foi graficada para $K_{av} \times \log(\text{Peso Molecular})$. Desta forma, os pesos moleculares das construções foram estimados a partir da curva de calibração.

Os ensaios de *cross-linking* químico foram realizados com o reagente *Ethylene Glycol-Bis* (EGS) (Sigma Aldrich). As amostras foram incubadas com: 2 mM EGS para a construção SEPT2-C e 0,5 mM EGS para as demais, em um volume final de 40 µl, à temperatura ambiente e por 30 minutos. As reações foram paradas com a adição de Tris-HCl (pH 7.5),

para concentração final de 50 mM, e subsequentemente analisadas em gel de Tricina/SDS-PAGE (16%).

3.4 Espectroscopia de Dicroísmo Circular – CD

A espectroscopia de dicroísmo circular, CD (do inglês *Circular Dichroism*), utiliza o fenômeno de dependência da absorção da radiação circularmente polarizada em relação ao sentido de polarização (circularmente polarizada para a esquerda, L, ou para a direita, R) para estimar o conteúdo de estrutura secundária de proteínas em solução (49). Uma onda eletromagnética linearmente polarizada pode ser decomposta em duas componentes circularmente polarizadas de iguais magnitudes, uma de polarização L e outra de polarização R, figura 3.2(A).

Figura 3.2 – (A) Representação de uma onda linearmente polarizada decomposta em duas componentes circularmente polarizadas, R e L. (B) Representação de uma onda elipticamente polarizada, onde o eixo maior da elipse está rotacionado de um ângulo α em relação ao eixo de polarização da onda inicial.

Ao passar por uma solução protéica, uma das componentes é mais absorvida, assim, as duas componentes não mais apresentarão a mesma intensidade. Desta forma, a radiação inicial que era linearmente polarizada torna-se elipticamente polarizada. Sendo que a forma da elipse é determinada pelo ângulo ψ , figura 3.2(B), o qual é chamado de elipicidade. Usualmente uma medida de CD é apresentada em elipicidade molar por resíduo (de unidade graus $M^{-1} m^{-1}$, ou, de forma equivalente, graus $cm^2/dmol$), a qual é definida por: $[\psi] = \psi/(N \cdot C \cdot L)$, onde N é o número de resíduos da proteína, C é a concentração (em molar, M) e L é o comprimento da cubeta (em metro, m). A figura 3.3 apresenta espectros representativos

de CD para as principais classes de estrutura secundária (49). Para o espectro de alfa-hélice, notamos a presença de dois mínimos em torno de 208 e 222 nm, um máximo entre 190 e 195 nm e um ponto de intensidade nula próximo a 200 nm.

Figura 3.3 – Espectros representativos de CD para as principais classes de estrutura secundária (49).

As medidas de espectroscopia de dicroísmo circular foram realizadas em um espectropolarímetro J-715 (Jasco Inc.) equipado com controle de temperatura, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1 mm de caminho ótico. Os espectros de CD foram medidos de 250 nm a 195 nm, sendo determinados como média sobre 4 acumulações, usando a velocidade de *scanning* de 20 nm/min., largura de banda espectral de 1 nm e tempo resposta de 0,5 s. Os dados foram obtidos em escala de elipticidade.

As medidas de CD foram realizadas em tampão 20 mM Fostato de Potássio, 50 mM NaCl e pH 7,5, com as seguintes concentrações: 25 μ M para SEPT2-C, 10 μ M para SEPT6-C, 12 μ M para SEPT7-C, 5 μ M para SEPT6-C/SEPT6-C, 50 μ M para SEPT2-CC, 50 μ M para SEPT4-CC e 25 μ M para SEPT6-CC. Para a obtenção das estimativas de porcentagem de estrutura secundária, utilizamos os programas SELCON3, CONTIN e CDS, pertencentes ao pacote CDDPro (50). As curvas de desnaturação térmica foram geradas medindo-se o valor de

elipcidade apenas no comprimento de onda 222 nm, sendo que as amostras foram aquecidas de 4 a 90 °C, à velocidade de 1C/min..

3.5 Ressonância Plasmônica de Superfície – SPR

A técnica de SPR (do inglês *Surface Plasmon Resonance*) utiliza o fenômeno de ressonância plasmônica de superfície para monitorar em tempo real interações entre duas ou mais moléculas. Em termos operacionais, para ensaios de interação entre apenas duas moléculas, a técnica consiste na imobilização de uma das moléculas (ligante) a um *sensor chip* e posterior aplicação sobre a superfície do *sensor chip* de solução contendo a outra molécula (analito), figura 3.4. O *sensor chip* consiste de uma superfície de vidro coberta com uma fina camada de ouro. Para os *chips* utilizados no trabalho, após a camada de ouro, havia uma camada de dextrano carboximetilado, a qual mantém as proteínas em ambiente hidrofílico, preservando o enovelamento das mesmas.

Figura 3.4 – Esquema geral simplificado do sistema de detecção para a técnica de SPR.

O feixe de luz polarizada incidente sobre a superfície de ouro excita ondas superficiais de plasma na mesma (plasmons de superfície). A grandeza monitorada num experimento de SPR é o ângulo de maior absorção da luz polarizada, o qual depende do índice de refração do meio abaixo da camada de ouro. Por sua vez, o índice de refração varia com a quantidade de massa de proteína presente na região. Resumidamente, a ligação de moléculas à superfície do *sensor chip* gera uma resposta proporcional à massa de moléculas presentes, sendo que

mudanças na quantidade de massa ligada à superfície do chip podem ser detectadas até pico gramas por mm^2 . Os dados experimentais são mostrados em um gráfico (sensorgrama) de resposta medida, em unidades de ressonância (RU), em função do tempo. Uma unidade RU é equivalente a um pico grama por mm^2 na superfície do chip.

Todas as medidas de SPR foram realizadas à temperatura de 15 °C com fluxo de 10 $\mu\text{L}/\text{min.}$, em um equipamento Biacore X[®] (BIAcore AB, Uppsala, Sweden). As amostras foram diluídas em tampão de corrida (10 mM de Hepes, 300 mM NaCl, 0,005% surfactante e pH 7,4) por diluições seriadas. Os tampões foram filtrados e desgaseificados antes do uso.

Utilizamos o procedimento padrão de preparo da superfície do *sensor chip* para a imobilização via *His-tag*. Em linhas gerais, o *sensor chip* NTA (GE Healthcare) foi inserido no equipamento e uma injeção de 1 minuto do tampão de corrida com 500 mM NiCl_2 foi aplicada para carregar o chip com níquel, seguida por um procedimento de lavagem. A captura dos domínios SEPT6-C ou SEPT7-C foi realizada através de uma injeção de 15 μL de solução protéica a 100 nM, sobre a célula dois apenas. Tal procedimento gerou uma superfície estável, como pode ser observado pelas linhas retas no início dos sensogramas apresentados. Por fim, os dados de interação foram obtidos por injeções de SEPT6-C ou SEPT7-C sobre a superfície do chip. Após cada ciclo de medidas a superfície foi regenerada por uma injeção de 30 segundos de solução contendo 0,35 M EDTA dissolvida em tampão de corrida, seguida por um procedimento de lavagem.

O procedimento de preparo do *sensor chip* para o acoplamento amina foi realizado a 25 °C utilizando tampão de corrida e fluxo de 5 $\mu\text{L}/\text{min.}$. As amostras foram preparadas na concentração de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em tampão 10 mM acetato de sódio, pH 4,0 (previamente determinada por procedimentos de triagem de pH) e injetadas por: SEPT2-C = 7 min., SEPT6-C = 12 min. e SEPT7-C = 3 min.). A regeneração foi obtida pela injeção de uma solução contendo 10 mM de glicina em pH 1,5.

Para remover efeitos decorrentes de mudança do índice de refração das amostras, as respostas da superfície de referência foram subtraídas das respostas da superfície com os peptídeos imobilizados. Para a remoção de artefatos que possam ocorrer sistematicamente durante as injeções utilizamos o processo de referência dupla, o procedimento no qual a resposta de uma injeção de tampão é subtraída de todas as medidas. Todos os dados cinéticos foram analisados por ajuste global de pelo menos seis sensogramas, incluindo duplicatas. O programa BIAevaluation 4.1 foi usado para realizar o procedimento descrito acima.

3.6 Ultracentrifugação analítica

A ultracentrifugação analítica é uma técnica hidrodinâmica utilizada para, dentre outros, estudos de estado de oligomerização e de propriedades termodinâmicas de proteínas. Essencialmente, a propriedade medida é a distribuição de concentração protéica ao longo da direção radial a um dado tempo. A medida da absorbância da amostra em um dado comprimento de onda, a posições fixas da célula, é o método mais empregado para a determinação da distribuição de concentração. Existem basicamente dois tipos de experimentos com uma ultracentrífuga analítica: velocidade de sedimentação e equilíbrio de sedimentação (51).

Em experimento de velocidade de sedimentação uma solução uniforme é inicialmente colocada no topo da célula e então posta a girar à alta frequência angular, fazendo com que as proteínas sedimentem de forma relativamente rápida. Embora a velocidade das partículas individualmente não seja acessível, o movimento coletivo das proteínas pode ser medido. Desta forma, pode-se determinar o coeficiente de sedimentação, s , (velocidade da partícula por unidade de aceleração gravitacional) o qual depende diretamente da massa das partículas e inversamente do coeficiente de atrito.

Por outro lado, em experimentos de equilíbrio de sedimentação a velocidade do rotor é menor do que no caso anterior. As partículas do soluto não são “pelletadas” para o fundo da célula. Neste caso, o processo de difusão torna-se relevante. As duas “forças” opostas entram em equilíbrio, fazendo com que a distribuição de concentração protéica fique constante ao longo da direção radial. No equilíbrio, a concentração do soluto aumenta exponencialmente em direção ao fundo da célula.

Todos os experimentos de ultracentrifugação analítica foram realizados em uma ultracentrífuga analítica Optima XL-A (Beckman-Coulter, Palo Alto, CA), equipada com sistema de detecção de absorbância no UV-visível. O tampão utilizado foi 20mM de fosfato de sódio, 50 mM NaCl e pH 7,5. Nos experimentos de velocidade de sedimentação as amostras foram centrifugadas a 48 Krpm à temperatura de 20°C. As concentrações utilizadas foram 14, 28, 75 e 150 μ M para SEPT2-C e 8,5, 10, 20 e 35 μ M para SEPT6-C/SEPT7-C. As funções distribuição de coeficiente de sedimentação foram determinadas via ajuste dos “profiles” das velocidades de sedimentação com mínimos quadrados lineares usando o programa SEDFIT (52). Para a conversão dos valores de s para a condição padrão (20°C em

água), utilizou-se o programa SEDNTERP (acessado via o servido RASMB) (53). As razões dos coeficientes de fricção, f/f_0 (onde f e f_0 representam, respectivamente, o coeficiente de fricção experimental e o coeficiente mínimo de fricção, assumindo forma esférica para a proteína) foram calculadas com o programa SEDNTERP.

Os experimentos de equilíbrio de sedimentação foram realizados às velocidades de 17, 23 e 32 Krpm à temperatura de 20°C, com volumes iniciais de 85 µl. As concentrações utilizadas foram 9, 36 e 181 µM para SEPT2-C e 1,5, 14 e 53 µM para SEPT6-C/SEPT7-C. Após a leitura no equilíbrio, uma corrida a alta velocidade (48 Krpm) foi realizada para estimar o “offset” da linha de base. As massas moleculares médias das amostras foram calculadas por ajuste do modelo de espécies simples aos dados experimentais usando o software Hetero-Analysis (54). Os volumes específicos parciais foram calculados a partir da estrutura primária usando o programa SEDNTERP.

3.7 Cristalização

A principal técnica para a resolução de estruturas tridimensionais de proteínas e outras macromoléculas biológicas é a cristalografia por difração de raios X. Comumente, a parte crítica na resolução de estruturas proteicas via cristalografia de raios X é a obtenção de cristais de qualidade apropriada. O processo de cristalização, principalmente de macromolécula, envolve a interferência de diversas variáveis como: estabilidade da amostra, pH, temperatura, grau de pureza, concentração e natureza de agentes precipitantes, força iônica, entre outras. Como resultado de tamanha variabilidade de parâmetros, o processo de cristalização torna-se altamente empírico. Desta forma, os ensaios de cristalização geralmente iniciam-se com triagens em muitas condições (triagem química), as quais são escolhidas com base na estatística de sucesso de cristalização para as macromoléculas que já foram cristalizadas.

Todos os ensaios iniciais de cristalização foram realizados de forma automática com o uso do robô de cristalização HoneyBee 931 (Genomic Solutions Inc), com *kits* de 96 condições e em placa de gota sentada, com três poços por condição. Os *kits* utilizados nos experimentos foram os fornecidos pelos fatoriais *Classics* e *Classics II* suíte, PEGs e PEGs II suíte, AmSo4 suíte e Cryos suíte, todos adquiridos da empresa Qiagen. Além destes, foram

utilizados mais dois kits da empresa Hampton Research: *crystal screen HT* e *salt RX HT*. Nos ensaios robóticos, o volume de solução precipitante no poço foi de 80 μl . Os volumes das amostras, suas concentrações e os volumes das soluções precipitante na gota variaram caso a caso. As tabelas de 3.3 a 3.6 apresentam todos os kits utilizados durante os ensaios robóticos de cristalização.

Tabela 3.3 – Ensaios robóticos de cristalização para as construções SEPT2-C e SEPT6-C/SEPT7-C. Volume de amostra X Volume de solução precipitante.

<i>Kit</i>	SEPT2-C (7,5 mg/ml)	SEPT2-C (12 mg/ml)	SEPT6-C/SEPT7-C (10 mg/ml)	SEPT6-C/SEPT7-C (15 mg/ml)	SEPT6-C/SEPT7-C (16 mg/ml) com <i>His-tag</i>
PEGs	1 μl X 1 μl	1 μl X 1 μl	1 μl X 1 μl	1 μl X 1 μl	1 μl X 1 μl
PEGs II	1 μl X 1 μl	1 μl X 1 μl	1 μl X 1 μl	1 μl X 1 μl	1 μl X 1 μl
Classics	1 μl X 1 μl	1 μl X 1 μl	1 μl X 1 μl	1 μl X 1 μl	1 μl X 1 μl
AmSO ₄			1 μl X 1 μl		

Tabela 3.4 – Ensaios robóticos de cristalização para as construções SEPT2-CC, SEPT4CC e SEPT6-CC, sem adição de ZnSO₄. Volume de amostra X Volume de solução precipitante.

<i>Kit</i>	SEPT2-CC (16 mg/ml)	SEPT4-CC (16 mg/ml)	SEPT6-CC (4,3 mg/ml)	SEPT6-CC (10 mg/ml)
PEGs	1 μl X 1 μl	1 μl X 1 μl	1 μl X 0,5 μl	1 μl X 1 μl
PEGs II	1 μl X 1 μl	1 μl X 1 μl	1 μl X 0,5 μl	1 μl X 1 μl
Classics	1 μl X 1 μl	1 μl X 1 μl		1 μl X 1 μl
Classics II			1 μl X 0,5 μl	1 μl X 1 μl
Crystal Screen			1 μl X 0,5 μl	1 μl X 1 μl

Tabela 3.5 – Ensaios robóticos de cristalização para as construções SEPT2-CC e SEPT4CC, na presença de 7 mM de ZnSO₄. Volume de amostra X Volume de solução precipitante.

<i>Kit</i>	SEPT2-CC (10 mg/ml)	SEPT4-CC (10 mg/ml)
PEGs	1 μl X 1 μl	1 μl X 1 μl
PEGs II		1 μl X 1 μl

Tabela 3.6 – Ensaios robóticos de cristalização para SEPT3-GC. Volume de amostra X Volume de solução precipitante.

<i>Kit</i>	Forma <i>apo</i> (7 mg/ml) com <i>His-tag</i>	Forma <i>apo</i> (5 mg/ml)	Com GDP (5 mg/ml)	Com GTPγS (5 mg/ml)
Classics	1 μ l X 1 μ l	1 μ l X 1 μ l	1 μ l X 1 μ l	1 μ l X 1 μ l
Classics II	1 μ l X 1 μ l	1 μ l X 1 μ l	1 μ l X 1 μ l	1 μ l X 1 μ l
PEGs	1 μ l X 1 μ l	1 μ l X 1 μ l	1 μ l X 1 μ l	1 μ l X 1 μ l
PEGs II	1 μ l X 1 μ l	1 μ l X 1 μ l	1 μ l X 1 μ l	1 μ l X 1 μ l
AmSo ₄	1 μ l X 1 μ l	1 μ l X 1 μ l	1 μ l X 1 μ l	1 μ l X 1 μ l
Cryos	1 μ l X 1 μ l		1 μ l X 1 μ l	1 μ l X 1 μ l
Salt RX HT		1 μ l X 1 μ l	1 μ l X 1 μ l	1 μ l X 1 μ l
Crystal screen HT			1 μ l X 1 μ l	1 μ l X 1 μ l

Para as condições que apresentaram resultado positivo na etapa automática, realizamos ensaios manuais de forma a refinar as condições iniciais. Para estes ensaios utilizamos placas de gota sentada, com lamínulas siliconizadas. Os volumes de solução no poço foram de 500 μ l, ao passo que nas gotas os volumes utilizados foram de 1,5 μ l X 1,5 μ l. Em todos os casos, a menos que estipulado em contrário no texto, as placas foram armazenadas em câmara fria a 18 °C.

3.8 Coletas de dados e processamentos para os cristais obtidos

Durante o trabalho, obtivemos cristais para três construções diferentes de *coiled coils* de septinas humanas, SEPT2-CC, SEPT4-CC e SEPT6-CC, além de cristais para SEPT3-GC. Diversos cristais foram montados em *cryoloops* e congelados em nitrogênio líquido. Utilizamos como crioprotetor a solução mãe contendo 20% de etileno glicol, sendo que, no caso de SEPT2-CC, a solução mãe para o congelamento não possuía sulfato de zinco. Os dados de difração de raios X foram coletados na linha MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e na linha ID29 do *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF).

Não coletamos nenhum conjunto completo de dados para SEPT6-CC, para esta construção coletamos apenas algumas imagens para averiguar a qualidade dos cristais. Para SEPT2-CC e SEPT4-CC coletamos alguns conjuntos. Utilizamos os programas iMosflm (55), Scala (56) e XDS (57) para a redução e o escalonamento dos dados. As tentativas de resolução das estruturas foram realizadas com o método de substituição molecular implementado no programa Phaser (58). Os modelos iniciais de busca foram gerados com o programa modeller 9v8 (59). Dos dois, até o momento, obtivemos solução apenas para o cristal da construção SEPT4-CC. A estrutura obtida via substituição molecular foi refinada utilizando-se o programa Phenix (60) e visualizada e modelada em espaço direto com o programa Coot (61).

Para a construção SEPT3-GC coletamos apenas um conjunto de dados, na linha ID29 do ESRF. A redução e o escalonamento dos dados de tal conjunto foram realizados com o programa XDS (57). Para a resolução da estrutura utilizamos o método de substituição molecular implementado no programa Phaser (58). O modelo inicial de busca foi preparado com o programa *Chainsaw*, do pacote CCP4, a partir da estrutura do domínio SEPT2-G (código PDB 2QNR). Após a substituição molécula, a estrutura foi submetida a ciclos de refinamento utilizando-se o programa Phenix (60). Entre dois ciclos de refinamento, os modelos e os mapas de densidade eletrônica eram visualizados e modelados em espaço direto utilizando-se o programa Coot (61).

3.9 Ressonância Magnética Nuclear para o domínio SEPT2-C

A espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de proteínas é um campo da biologia molecular estrutural no qual se utiliza o fenômeno de interação do spin nuclear com campos eletromagnéticos externos para a obtenção de informações sobre estrutura e dinâmica de proteínas. Tal técnica permite a determinação de estruturas protéicas, a nível atômico, diretamente em solução. Uma característica fundamental da técnica é a necessidade de que a amostra em questão possua núcleos atômicos com momento angular de spin não nulo. Núcleos com spin nulo não apresentam o fenômeno de ressonância magnética nuclear.

Os núcleos mais usados para o estudo estrutural de proteínas através de RMN são: ^1H , ^{13}C e ^{15}N , todos possuindo spin $\frac{1}{2}$. Dos três núcleos, principalmente devido à sua alta abundância natural ($\sim 100\%$), o ^1H é o mais utilizado em medidas com amostras não marcadas. As abundâncias naturais para ^{13}C e ^{15}N são 1,1 e 0,4%, respectivamente. Assim, para usarmos a técnica eficientemente para espectros de nitrogênio e/ou carbono, devemos fazer uso do processo de marcação isotópica uniforme da amostra com ^{15}N e/ou ^{13}C . Como descrito por Li et al (62), ambas as marcações podem ser realizadas de forma direta utilizando-se meio mínimo (também conhecido como meio M9) na etapa de expressão, ao invés do meio LB.

Utilizamos dois tipos de estratégia para a obtenção de informações via RMN para o domínio em questão: i- medidas de espectros 2D homonucleares e ii- medidas de espectros 2D e 3D heteronucleares. Para a estratégia com espectros 2D homonucleares, realizamos os experimentos de TOCSY e NOESY, utilizando as técnicas tradicionais desenvolvidas por Wüthrich (63). Para a segunda estratégia, realizamos os experimentos 2D ^{15}N -HSQC e ^{13}C -HSQC e os experimentos 3D HNCA, CBCA(CO)NH e HCCH-TOCSY.

As medidas foram realizadas no grupo do Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer (Universidade de Regensburg, Alemanha). Todos os espectros foram coletados no espectrômetro Bruker AMX 800, equipado com crio-sonda e com controlador de temperatura. O deslocamento químico do ^1H foi referenciado em relação ao ácido 4,4-dimetil-4-silapentane-1-sulfônico (DSS). As ressonâncias dos núcleos ^{13}C e ^{15}N foram calibradas indiretamente seguindo as recomendações da IUPAC (64). Os dados foram processados com o programa TOPSPIN (Bruker, Karlsruhe) e visualizadas com o programa AUREMOL (www.auremol.de).

As medidas foram realizadas à temperatura de 25 °C. A concentração da amostra foi de 1 mM, em tampão com 50 mM de fosfato de potássio (pH 6,2), 30 mM NaCl, 1 mM NaN_3 , 50 μM DSS e 10% D_2O . Para as medidas dos espectros ^{13}C -HSQC e HCCH-TOCSY a amostra foi liofilizada e re-solubilizada no mesmo volume de D_2O .

3.10 Análises *in silico* dos domínios C-terminal de septinas humanas

As análises *in silico* foram realizadas com dois programas, CLUSTAL X e COILS, para o alinhamento das sequências e para as predições teóricas de *coiled coils*, respectivamente. A versão utilizada do programa CLUSTAL X foi a 2.0.10 (65). Para o COILS a versão utilizada foi a 2.2 (66), sendo o programa acessado via o servidor http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html. Os parâmetros de entrada para o programa COILS foram: Window width (all), Matrix (MTK), 1.5 fold weighting of positions a,d (yes) e Query sequence (Plain Text).

Com o parâmetro “Window width = all”, o programa COILS retorna três soluções para a predição, considerando a janela para cálculos de 14 (2x7), 21 (3x7) e 28 (4x7) resíduos. Cada uma das soluções corresponde a um gráfico da probabilidade de que o resíduo em questão esteja em *coiled coil* em função do número do resíduo. O critério utilizado no trabalho para dizer que um dado resíduo tem predição de *coiled coil* foi que a probabilidade de que este resíduo esteja em *coiled coil* seja maior ou igual a 0,6 nas três janelas de cálculo.

Capítulo 4

Resultados e discussões

Slow though the process of selection may be, if feeble man can do much by his powers of artificial selection, I can see no limit to the amount of change, to the beauty and infinite complexity of the co-adaptations between all organic beings, one with another and with their physical conditions of life, which may be effected in the long course of time by nature's power of selection.

Charles Darwin

Capítulo 4 Resultados e discussões

Neste capítulo apresentaremos e discutiremos os resultados obtidos para o estudo dos domínios C-terminal das septinas humanas, bem como a estrutura obtida para a construção SEPT3-GC. O capítulo de resultados e discussões foi escrito de forma que, em termos de entendimento geral do trabalho, ele seja independente, na medida do possível, do capítulo de metodologia.

4.1 Definições dos domínios C-terminal das septinas do complexo 2/6/7

Os domínios C-terminal utilizados neste trabalho constituem as regiões finais das septinas, perfazendo quase todos os resíduos finais que são “invisíveis” na estrutura do complexo 2/6/7 (33). A figura 1.11 apresenta as estruturas primárias das septinas do complexo, destacando os resíduos “visíveis” na estrutura e os resíduos que definem as regiões C-terminal utilizadas durante o trabalho.

Os domínios utilizados foram nomeados por SEPT2-C, SEPT6-C e SEPT7-C. Para as subclonagens, utilizamos os oligonucleotídeos iniciadores mostrados na figura 3.1, sendo todos planejados para gerarem insertos compatíveis com o vetor pET-28a(+). Desta forma, os domínios podem ser expressos fusionados a uma cauda contendo 6xHis e um sítio de clivagem por trombina. Para os domínios SEPT2-C e SEPT6-C incluímos um resíduo de triptofano extra no início do domínio, para que as construções sejam “visíveis” na região ultravioleta. A figura 4.1 apresenta as estruturas primárias, junto com os principais parâmetros, das três construções após a clivagem com trombina.

SEPT2-C (Após clivagem com trombina)

GSHMGRKVENEDMNKDQILLEKEAELRRMQEMIARMQAQMOMQMQGGDGDGGALGHHV

59 resíduos

Peso = 6,7 KDa

pI teórico = 5,5

$\epsilon_{280\text{nm}} = 5500,0 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

SEPT6-C (Após clivagem com trombina)

GSHMASWGFKDTPDPSKPFSLQETYEAKRNEFLGELQKKEEEMRQMFVQRVKEKEAELKEAE
KELHEKFDRLKKLHQDEKKKLEDKKKSLDDEVNAFKQRKTAAELLQSQGSQAGGSQTLKRDK
EKKN

128 resíduos

Peso = 15,1 KDa

pI teórico = 8,7

$\epsilon_{280\text{nm}} = 6990 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

SEPT7-C (Após clivagem com trombina)

GSHMTYNGVDNNKNKGQLTKSPLAQMEEEERREHVAKMKKMEMEMEQVFEMKVKEKVQKLKDS
EAELORRHEQMKNLEAQHKELEEKRRQFEDEKANWEAQQRILEQQNSSRTLEKNKKKGKIF

124 resíduos

Peso = 15,0 KDa

pI teórico = 9.4

$\epsilon_{280\text{nm}} = 6990.0 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Figura 4.1 – Estrutura primária dos domínios utilizados, após clivagem com trombina. Em vermelho, resíduos que sobram do “His-tag” após a clivagem e, em verde, resíduos de triptofano extra.

4.2 Amplificação e clonagem dos domínios C-terminal das septinas do complexo 2/6/7

Os cDNAs dos domínios C-terminal das septinas 2, 6 e 7 foram amplificados através da técnica de PCR, utilizando como molde inicial os cDNAs das proteínas inteiras previamente clonados em nosso grupo de pesquisa. O domínio SEPT2-C foi clonado, de forma análoga aos outros dois domínios, pelo aluno de doutorado do grupo Júlio Cesar Pissuti Damalio. A figura 4.2 mostra a análise dos produtos de PCR para os domínios SEPT6-C e SEPT7-C, realizada em gel de agarosa corado com brometo de etídeo.

Figura 4.2 – Gel de agarosa (0,8%) corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml). 1 - Marcador de pares de base. 2 - Produto de PCR para SEPT6-C. 3 - Produto de PCR para SEPT7-C.

As reações de PCR foram realizadas com sucesso, apresentando o tamanho esperado para os domínios, em torno de 380 bp para ambos os domínios. Os fragmentos observados foram extraídos do gel, clonados no vetor de propagação “TOPO TA Cloning” e propagados em bactérias *E. coli* DH5α. Os sequenciamentos dos vetores confirmaram as subclonagens dos cDNAs dentro da fase correta de leitura.

Após os seqüenciamentos, os vetores foram submetidos às reações de digestão com suas respectivas endonucleases, figura 3.1. Os fragmentos digeridos e purificados foram submetidos à reação de ligação com o vetor pET28a(+) (linearizado com as mesmas enzimas de restrição). Após as reações de ligação, os vetores contendo os insertos foram propagados em bactérias *E. coli* DH5α e armazenados à temperatura de -80 °C para subsequente utilização.

Os vetores pET28a(+) contendo os insertos para as construções SEPT2-C, SEPT6-C e SEPT7-C foram nomeados por pET28a-SEPT2-C, pET28a-SEPT6-C e pET28a-SEPT7-C, respectivamente.

4.3 Expressão e purificação dos domínios C-terminal das septinas do complexo 2/6/7

Os plasmídeos de expressão pET28a-SEPT2-C, pET28a-SEPT6-C e pET28a-SEPT7-C foram usados para transformar cepas de *E. coli* BL21(DE3). Após expressão as células foram centrifugadas, ressuspensas em tampão A (20 mM Tris, 1M NaCl e pH 7,5), lisadas,

centrifugadas novamente e os sobrenadantes foram aplicados em coluna de afinidade de níquel (Ni-NTA). A lavagem da coluna se deu através da passagem do tampão A com gradiente crescente da concentração de imidazol: 25 ml com 10 mM de imidazol, 25 ml com 30 mM de imidazol, 25 ml com 50 mM de imidazol. Até este ponto a purificação para os três domínios foi idêntica.

No caso de SEPT2-C, após a lavagem da coluna o domínio foi eluído em tampão B (20 mM Tris, 50 mM NaCl e pH 7,5) com 300 mM de imidazol. A figura 4.3(A) mostra o gel de Tricina SDS/PAGE da primeira parte da purificação do domínio. Para a retirada do imidazol, a amostra foi dialisada em tampão B. Trombina protease foi adicionada para a clivagem da cauda. Por fim, a amostra foi novamente aplicada em coluna de afinidade níquel (Ni-NTA), em tampão B com 30 mM de imidazol, seguida por aplicação em coluna de benzamidina, para retirada do *His-tag* clivado e da trombina protease, respectivamente. A figura 4.3(B) mostra o gel de Tricina SDS/PAGE para a parte final da purificação. O rendimento final da purificação de SEPT2-C ficou entre 15 e 20 mg de proteína por litro de cultura.

Figura 4.3 – Géis de Tricina SDS/PAGE (16%) para o domínio SEPT2-C. (A) 1- Padrão de massa molecular. 2- Cultura não induzida. 3 - Cultura após indução. 4 - Sobrenadante. 5 - Pellet. 6 - Amostra após passar pela coluna. 7 - Lavagem com 25 ml de tampão A com 10 mM de imidazol. 8 - Lavagem com 25 ml de tampão A com 30 mM de imidazol. 9 - Lavagem com 25 ml de tampão A com 50 mM de imidazol. 10 - Eluição em 15 ml de tampão A com 300 mM de imidazol. (B) 1- Padrão de massa molecular. 2 - Eluição em 15 ml de tampão A com 300 mM de imidazol. 3 - Após clivagem *over night* com trombina. 4 - Amostra após passagem pela coluna de benzamidina.

Um Protocolo quase idêntico foi utilizado para a purificação do domínio SEPT6-C, com a diferença de que o tampão utilizado neste caso foi sempre o tampão A. A figura 4.4 mostra o gel de SDS/PAGE da purificação. Também neste caso, o rendimento final da purificação ficou entre 15 e 20 mg de proteína por litro de cultura. Contrariamente ao domínio SEPT2-C, a construção SEPT6-C mostrou-se muito instável, sendo este o motivo da utilização de tampão com 1M NaCl. Para as medidas realizadas em tampão B, trabalhamos

sempre com a proteína pouco concentrada (concentração $< 0,5$ mg/ml). Mesmo com 1 M NaCl não podíamos concentrar muito a solução. Em várias das purificações iniciais o domínio precipitou no momento da primeira diálise, a diálise para a retirada do imidazol.

Figura 4.4 – Gel de SDS/PAGE (12%) para o domínio SEPT6-C. 1- Padrão de massa molecular. 2- Cultura não induzida. 3 - Cultura após indução. 4 - Sobrenadante. 5 - Pellet. 6 - Lavagem com 25 ml de tampão A com 50 mM de imidazol. 7 - Eluição em 15 ml de tampão A com 300 mM de imidazol. 8 – Após clivagem *over night* com trombina. 9 - Amostra após passagem pela coluna de benzamidina.

Por fim, para SEPT7-C, após a lavagem da coluna a amostra foi eluída em tampão A com 300 mM de imidazol. A figura 4.5 mostra o gel de SDS/PAGE da primeira parte da purificação. Neste caso, vemos que a amostra eluída não estava pura, sendo acompanhada por contaminantes de baixo peso menor, possivelmente versões truncadas do domínio de interesse. Versões truncadas possuem duas causas principais, ou resultado de proteólise devido a proteases da bactéria ou a terminações pré-cose durante a síntese. Desta forma, para tentar resolver o problema realizamos a purificação posterior com os inibidores de protease PMSF, leupeptina e pepstatina A, contudo, o resultado obtido foi idêntico. Tentamos também outras cepas de *E. coli*, Rosetta(DE3) e BL21-CodonPlus(DE3), contudo, novamente as duas bandas se mantiveram.

Figura 4.5 – Gel de SDS/PAGE (12%) para o domínio SEPT7-C. 1- Padrão de massa molecular. 2- Cultura não induzida. 3 - Cultura após indução. 4 - Sobrenadante. 5 - Pellet. 6 - Amostra após passar pela coluna. 7 - Lavagem com 25 ml de tampão A com 30 mM de imidazol. 8 - Lavagem com 25 ml de tampão A com 50 mM de imidazol. 9 - Eluição em 15 ml de tampão A com 300 mM de imidazol.

Como não conseguimos eliminar o contaminante modificando a forma de expressão e lise das células, tivemos de encarar o desafio de separar as duas bandas. Aumentamos a concentração de imidazol no processo de lavagem e tentamos filtração em gel, em coluna Superdex 75, mas, como a diferença de peso entre as duas bandas é pequena, não obtivemos sucesso em nenhuma das duas tentativas. O passo seguinte foi tentar uma cromatografia de troca iônica. Como o pI teórico do domínio SEPT7-C é alto, optamos por cromatografia de troca catiônica, em coluna Mono STM HT. Em tal abordagem, as proteínas foram eluídas da coluna de afinidade de níquel (primeira etapa) em tampão 20 mM Tris, 150 mM Imidazol, 200 mM NaCl e pH 7,5, num volume de 40 ml. Após várias tentativas chegamos a uma função gradiente de sal (NaCl) capaz de separar as duas formas. A figura 4.6(A) mostra o cromatograma de troca catiônica obtido, junto com a função gradiente de NaCl. A figura 4.6(B) mostra o gel de SDS/PAGE desta etapa do processo de purificação.

Figura 4.6 – Cromatografia de troca catiônica para a construção SEPT7-C. (A) Cromatograma e função gradiente de NaCl. Tampão A: 200 mM NaCl, 20 mM Tris e pH 7,5. Tampão B: 1 M NaCl, 20 mM Tris e pH 7,5. (B) Análise em SDS/PAGE (12%): 1 - Padrão de massa molecular. 2 - Amostra aplicada. 3 - Fração não ligada (Volume de 6 ml). 4 - Início da eluição (Volume de 21,1 ml). 5 - Meio da eluição (Volume de 21,9 mL).

Após a cromatografia, trombina protease foi adicionada para a clivagem da cauda. Por fim, a amostra foi novamente aplicada em coluna de afinidade de níquel, com 30 mM de imidazol, seguida por aplicação em coluna de benzamidina, para retirada do *His-tag* clivado e da trombina protease, respectivamente. A figura 4.7 mostra o gel de SDS/PAGE para a parte final da purificação.

Figura 4.7 – Gel de SDS/PAGE (12%) para a parte final da purificação do domínio SEPT7-C. 1- Padrão de massa molecular. 2- Amostra após cromatografia de troca iônica. 3 – Após clivagem *over night* com trombina. 4 - Amostra após passagem pela coluna de benzamidina.

Assim como o domínio SEPT6-C, também a construção SEPT7-C mostrou-se instável, sendo que para as medidas realizadas em tampão B, trabalhamos sempre com a proteína pouco concentrada (concentração < 0,5 mg/ml). Também neste caso, mesmo em tampão com 1M de NaCl não podíamos concentrar muito a solução sem sinal de precipitação. Para SEPT7-C o rendimento final da purificação ficou entre 2 e 3 mg de proteína por litro de cultura, bem abaixo do rendimento de 15 e 20 mg de proteína por litro de cultura para as construções SEPT2-C e SEPT6-C.

Dado que a estrutura cristalográfica do complexo 2/6/7 sugere interação direta entre os domínios C-terminal das septinas 6 e 7, figura 1.10, decidimos fazer uma mistura equimolar dos dois domínios para verificar se desta forma aumentaríamos, ou não, a estabilidade das amostras. Para tal fim, purificamos ambas as construções separadamente, sendo a diálise final realizada em tampão B (20 mM Tris, 50 mM NaCl e pH 7,5), quantificamos as amostras e então misturamos de forma a obtermos uma solução equimolar. Embora os domínios individualmente tenham se mostrado instáveis, a mistura equimolar de SEPT6-C com SEPT7-C mostrou-se muito estável. Chegamos a concentrá-la a 15 mg/ml, sem sinal visível de precipitado. Tal fato foi nossa primeira evidência de interação direta entre os domínios. Baseado nesta observação, a partir de agora, chamaremos a mistura SEPT6-C/SEPT7-C de hetero-dímero ou hetero-domínio ou simplesmente complexo SEPT67-C, sendo que, em todos os casos, a obtenção do complexo SEPT67-C se deu como descrito acima.

4.4 Filtração em gel e *cross-linking* químico

Uma vez obtidos os domínios puros, iniciamos suas caracterizações. A primeira técnica utilizada foi a filtração em gel. A figura 4.8 apresenta os cromatogramas de filtração em gel, realizados em coluna Superdex 75, para os domínios SEPT2-C, SEPT6-C, SEPT7-C e SEPT6-C/SEPT7-C. Todas as corridas foram realizadas em tampão 20 mM Fostato de Potássio (pH 7,5) e 50 mM NaCl. As concentrações das amostras utilizadas foram 10 μ M para SEPT2-C, SEPT6-C e SEPT7-C e 5 μ M para o complexo SEPT67-C. Seus pesos moleculares aparentes em solução, determinados pela técnica, foram estimados em 16 KDa, 56 KDa, 51 KDa e 59 KDa, respectivamente. Tais resultados são compatíveis com a formação de oligômeros em solução, além de indicarem homogeneidade de estado oligomérico.

Figura 4.8 – Gel filtração para os domínios SEPT2-C, SEPT6-C, SEPT7-C e para a mistura SEPT6-C/SEPT7-C.

A estimativa dos pesos via filtração em gel são baseadas na comparação com proteínas globulares de peso definido (curva de calibração), assim, para proteínas que não possuem forma globular, é de se esperar desvios dos valores calculados em relação aos valores reais. No caso dos domínios C-terminal de septinas, estes possuem predição de estrutura do tipo *coiled coil*, a qual é alongada. Se as predições forem corretas, é de se esperar que os valores calculados via filtração em gel sejam maiores do que os valores reais.

Para uma melhor estimativa dos estados de oligomerização das construções, utilizamos a técnica de *cross-linking* químico, com EGS (*Ethylene Glycol-Bis*) como agente de ligação. A figura 4.9 mostra os géis de Tricina/SDS-PAGE para as construções antes e após as reações de *cross-linking* químico. Em adição às bandas observadas para monômeros antes das reações, bandas adicionais, correspondentes a dímeros, aparecem após a incubação com EGS. As reações foram realizadas com as seguintes concentrações protéicas: 25 e 100 μM para SEPT2-C; 10 μM para SEPT6-C e SEPT7-C; 10 e 25 μM o complexo SEPT67-C. É importante notar que não são observadas bandas correspondentes a oligômeros de ordem mais alta, como trímeros e tetrâmeros.

Figura 4.9 – Géis de Tricina/SDS-PAGE (16%) com os resultados de *Cross-linking* químico. (A) 1 - Padrão de massa molecular. 2 - SEPT2-C (25 μM). 3 - SEPT2-C (25 μM) com EGS. 4 - SEPT2-C (100 μM) com EGS. (B) 1 - Padrão de massa molecular. 2 - SEPT6-C (10 μM). 3 - SEPT6-C (10 μM) com EGS. 4 - SEPT7-C (10 μM). 5 - SEPT7-C (10 μM) com EGS. 6 - SEPT6-C/SEPT7-C (10 μM). 7 - SEPT6-C/SEPT7-C (10 μM) com EGS. 8 - SEPT6-C/SEPT7-C (25 μM) com EGS.

Tomados em conjunto, os resultados das duas técnicas são consistentes com a existência de dímeros estáveis em solução para todos os casos. Ou seja, vemos que as construções SEPT2-C, SEPT6-C e SEPT7-C formam homo-dímeros. No caso de SEPT6-C/SEPT7-C, a princípio, poderíamos ter tanto homo-dímeros quanto hetero-dímeros. Mas, como a observação de ganho de estabilidade para o complexo SEPT67-C sugere interação entre os domínios, seria de se esperar que a mistura de SEPT6-C com SEPT7-C se apresentasse de forma hetero-dimérica.

4.5 Espectroscopia de Dicroísmo Circular – CD

A espectroscopia de dicroísmo circular, CD, foi utilizada para estimar o conteúdo de estrutura secundária dos domínios e para monitorar suas transições de fase do tipo enovelado/desenovelado, analisando suas estabilidades térmicas. A figura 4.10 mostra os espectros de CD para os domínios SEPT2-C, SEPT6-C e SEPT7-C, junto com suas respectivas curvas de desnaturação e renaturação. As medidas foram realizadas em tampão 20 mM Fostato de Potássio (pH 7,5) e 50 mM NaCl. Os espectros de todas as construções, a baixa temperatura, são caracterizados pela presença de dois mínimos em torno de 208 e 222 nm, um indicativo de máximo próximo a 195 nm e por apresentarem intensidade nula próximo a 200 nm. Tais características são indícios de alto teor de estrutura secundária do tipo α -hélice, seção 3.4.

continua

continuação

Figura 4.10 – Espectros de CD e curvas de desnaturação e renaturação. (A) SEPT2-C, (B) SEPT6-C e (C) SEPT7-C.

Os espectros de CD foram analisados com três diferentes métodos, utilizando os programas SELCON3, CONTIN e CDS, pertencentes ao pacote CDPro. Para os domínios SEPT6-C, SEPT7-C e SEPT6-C/SEPT7-C estima-se de 60 – 70% de estrutura secundária do tipo α -hélice, ao passo que para SEPT2-C a estimativa é de 40 – 50%. Em todos os casos, as estimativas de fita β foram baixas, menores do que 5%.

Quanto às transições de fase: todas são reversíveis, todas apresentam um ponto isodicroico aproximado (ponto onde os espectros tomados a diferentes temperaturas se

interceptam) em torno de 203 nm e, portanto, sugerem que não existem intermediários em quantidades detectáveis. Um ponto isodicroico bem definido é um bom indicativo de transição entre dois estados. A tabela 4.1 apresenta os respectivos valores de T_m (temperatura de transição), assumindo o modelo de transição entre dois estados.

Tabela 4.1 – Temperaturas de transição para as construções.

Domínio	T_m (°C)
SEPT2-C	44,1
SEPT6-C	33,9
SEPT7-C	32,2
SEPT6-C/SEPT7-C	39,9

A figura 4.11(A) apresenta o comparativo entre as curvas de desnaturação para as construções SEPT6-C, SEPT7-C e o complexo SEPT67-C. É importante notar que todos os domínios apresentam alto teor de α -hélice, consistente com a presença de *coiled coils*, e que o complexo SEPT6-C/SEPT7-C apresenta maior estabilidade térmica do que os domínios individualmente. A figura 4.11(B) apresenta a variação de T_m em função do pH para SEPT6-C/SEPT7-C. O complexo é mais estável em pHs básicos, no intervalo aproximado de 7 a 10.

Figura 4.11 – (A) Comparativo entre as curvas de desnaturação para SEPT6-C, SEPT7-C e SEPT6-C/SEPT7-C. (B) Variação de T_m em função do pH para o complexo SEPT67-C.

Os resultados de CD, junto com a observação da seção 4.3, de que a mistura dos dois domínios apresenta menor tendência a agregar, sugerem interação direta entre os dois domínios. Somado aos resultados de *cross-linking* químico e gel filtração, nossos dados indicam que os domínios SEPT6-C e SEPT7-C são capazes de formarem homo-dímeros (com

alto teor de alfa-hélice), mas, que quando juntos apresentam maior tendência em formar hetero-dímeros (também com alto teor de alfa-hélice). No caso do domínio SEPT2-C, este é capaz de formar homo-dímeros e possui conteúdo moderado de estrutura secundária do tipo α -hélice.

4.6 Ressonância Plasmônica de Superfície – SPR

Usualmente, o estudo de interações proteína-proteína utiliza metodologias complementares para a obtenção de informações sobre o sistema em questão. Com o intuito de investigar as interações entre os domínios C-terminal de septinas humanas utilizamos a técnica de ressonância plasmônica de superfície, SPR. Tal técnica permite, dentre outras grandezas, a determinação das constantes de dissociação (K_D) para as interações estudadas. As medidas foram realizadas em conjunto com o Dr. Napoleão Fonseca Valadares, pós-doutorando do grupo.

Iniciamos nossas medidas com o estudo da interação entre os domínios SEPT6-C e SEPT7-C. Durante as medidas preliminares ficou evidente que o sinal de SPR para as interações entre os domínios variava em função da concentração de sal (NaCl). Desta forma, realizamos um conjunto de experimentos variando a concentração salina, figura 4.12. Os resultados mostram que à baixa concentração de NaCl é observada uma maior resposta de SPR. Enquanto que, aumentando da concentração salina há uma diminuição do sinal, até atingir um limiar em torno de 300 mM NaCl. Deve ser notado que ambos os domínios apresentam alto ponto isoelétrico (figura 4.1) e que a superfície de dextrano do *chip* é carregada negativamente em pH próximo ao neutro. Essas observações sugerem que interações eletrostáticas não específicas sejam as responsáveis pela resposta elevada observada durante os ensaios preliminares à baixa concentração salina. Essas interações não específicas são reduzidas significativamente quando o tampão contém uma concentração de NaCl maior ou igual a 300 mM. Desta forma, utilizamos 300 mM de NaCl em todos os ensaios cinéticos.

Figura 4.12 – Exemplo da dependência do sinal de SPR com a concentração de NaCl. O domínio SEPT7-C foi imobilizado via acoplamento amídico e SEPT6-C (640 nM) foi passado em solução. Tal efeito também foi observado para o acoplamento via *His-tag*.

Realizamos experimentos de interação entre SEPT6-C e SEPT7-C utilizando o método de imobilização amídica. A figura 4.13 mostra os sensogramas obtidos. Em 4.13(A) as medidas foram realizadas com o domínio SEPT6-C imobilizado e em 4.13(B) SEPT7-C era quem estava imobilizado no chip. Os dados são ajustados com o modelo 1:1 de Langmuir.

Figura 4.13 – Interação entre os domínios SEPT6-C e SEPT7-C, utilizando imobilização amídica. (A) SEPT6-C é imobilizado e SEPT7-C passado em solução. (B) SEPT7-C é imobilizado e SEPT6-C passado em solução.

Além da imobilização amídica, fizemos ensaios com imobilização via *His-tag*, figura 4.14. Em 4.14(A) as medidas foram realizadas com o domínio SEPT6-C estando imobilizado no *chip* e SEPT7-C sendo passado em solução, em 4.14(B) são mostrados os resultados para a situação inversa. Convém destacar que em todas as medidas as construções passadas livres em solução não possuíam o *His-tag*, apenas as que estavam imobilizadas na superfície do chip. Novamente, os dados foram ajustados com o modelo 1:1 de Langmuir. Vemos que o ajuste é

melhor para este segundo conjunto de medidas. Como ambos os domínios possuem mais de 20 resíduos de lisina, é se esperar que a imobilização amídica produzisse heterogeneidade de moléculas imobilizadas na superfície do chip, dificultando a interpretação dos dados. Assim, para o cálculo de K_D , utilizamos apenas o ajuste dos dados para a imobilização via *His-tag*.

Figura 4.14 – Interação entre os domínios SEPT6-C e SEPT7-C, utilizando imobilização via *His-tag*. (A) SEPT6-C é imobilizado e SEPT7-C passado em solução. (B) Situação inversa.

A tabela 4.2 apresenta os parâmetros cinéticos obtidos. Observa-se que a troca de construção imobilizada não traz influência significativa nos valores obtidos, dando validade interna aos resultados. Os dois valores para a constante de dissociação, K_D , foram 15,8 nM, com os valores das constantes de velocidade de associação e dissociação sendo da mesma magnitude para ambos os conjuntos de medidas.

Tabela 4.2 – Constantes de dissociação e constantes de taxa para as interações entre SEPT6-C e SEPT7-C, utilizando imobilização via *His-tag*.

Imobilizada	SEPT6-C	SEPT7-C
K_D (nM)	15,8	15,8
$k_a \times 10^4$ ($M^{-1}s^{-1}$)	$5,69 \pm 0,02$	$3,99 \pm 0,02$
$k_d \times 10^{-4}$ (s^{-1})	$9,0 \pm 0,1$	$6,3 \pm 0,2$

Realizamos ensaios de interação de SEPT2-C com SEPT6-C e SEPT7-C, a figura 4.15 apresenta os resultados obtidos. Para este caso utilizamos o acoplamento amídico. Em 4.15(A) são mostrados os resultados para a interação SEPT2-C/SEPT6-C e em 4.15(B) para a interação SEPT2-C/SEPT7-C. Observamos que mesmo as concentrações altas de SEPT2-C não são capazes de saturar a superfície do *chip*, indicando que as interações destes domínios com SEPT2-C são fracas, sendo a constante de dissociação, K_D , da ordem de grandeza de micro molar.

Figura 4.15 – Ensaios de interação de SEPT2-C com SEPT6-C (A e B) e SEPT7-C (C e D). Mesmo as concentrações altas de SEPT2-C não são capazes de saturar a superfície do *chip* (B e D).

Diferentes razões limitam o uso da técnica de SPR para quantificar eventos de auto-associação, muitos dos quais vem do fato de que, para cálculos termodinâmicos, as medidas devem ser realizadas em concentrações próximas do valor de K_D (67). Por exemplo, em concentração próxima a K_D para a dimerização, parte das proteínas imobilizada irá dimerizar na superfície do *chip*, enquanto que parte das proteínas em solução também estará em estado dimérico, diminuindo a concentração efetiva de monômeros em solução e na superfície do chip. Assim, para o estudo do homo dímero SEPT2-C utilizamos da técnica de ultracentrifugação analítica.

4.7 Ultracentrifugação analítica

Medidas de ultracentrifugação analítica foram realizadas com as construções SEPT2-C e SEPT6-C/SEPT7-C. Tais medidas foram realizadas pelo aluno de doutorado do grupo Júlio

Cesar Pissuti Damalio em colaboração com o Prof. Dr. José Manuel Andreu (Centro de Investigações Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madri, Espanha).

Para SEPT6-C/SEPT7-C os experimentos de velocidade de sedimentação, no intervalo de concentração de 8,5 a 53 μM , indicaram a presença de uma componente principal com coeficiente de sedimentação padrão $s_{20,w}$ de $1,95 \pm 0,1$, como pode ser visto na figura 4.16(A) (três curvas centradas no mesmo ponto). Os experimentos de equilíbrio de sedimentação confirmaram que o heterodímero é a principal espécie presente, com um peso molecular médio de $34,8 \pm 2,2$ KDa. O peso molecular do heterodímero, baseado na sequência, é 30 KDa, condizente com os dados de equilíbrio de sedimentação. A figura 4.16(B) mostra os dados de equilíbrio de sedimentação para a concentração de 53 μM . A razão dos coeficientes de fricção (f/f_0) calculado para a espécie principal é de 1,8, sendo que tal valor é condizente com uma forma geométrica moderadamente alongada. Desta forma, nossos dados indicam que o heterodímero SEPT6-C/SEPT7-C comporta-se como uma proteína moderadamente alongada, compatível com a forma geométrica de *coiled coils* diméricos.

Figura 4.16 – Ultracentrifugação analítica para o complexo SEPT6-C/SEPT7-C. (A) Experimento de velocidade de sedimentação. Vemos que as três curvas estão centradas em 1,95, indicando a presença da mesma espécie principal para as três concentrações. (B) Experimento de equilíbrio de sedimentação. A parte de baixo do gráfico apresenta a distribuição de resíduos para o ajuste.

Como o valor da constante de dissociação para o heterodímero, obtido via SPR, é de 15,8 nM, é esperado que na faixa de concentração de micro-molar esta espécie apresente-se como um heterodímero. Desta forma, os dados de ultracentrifugação analítica, em conjunto com os dados de filtração em gel, *cross-linking* químico e CD corroboram as predições teóricas, baseadas apenas na estrutura primária, de que o complexo SEPT6-C/SEPT7-C estrutura-se

como um *coiled coil* dimérico, alto teor de estrutura secundária do tipo hélice e forma não globular.

No caso de SEPT2-C, os experimentos de velocidade de sedimentação mostraram a dependência do estado de oligomerização com a concentração protéica. No intervalo de 14 a 150 μM observamos aumento gradual do coeficiente de sedimentação com o aumento da concentração, figura 4.17(A). Os ajustes dos dados de equilíbrio de sedimentação confirmaram a existência de equilíbrio monômero-dímero, com constante de dissociação de 4 μM . A figura 4.17(B) mostra os dados de equilíbrio de sedimentação obtidos para o domínio SEPT2-C para três valores de concentração.

Figura 4.17 – Ultracentrifugação analítica para o domínio SEPT2-C. (A) Experimento de velocidade de sedimentação. Vemos que o máximo das curvas desloca-se para a direita com o aumento da concentração, indicando a dependência do estado de oligomerização com a concentração. (B) Experimento de equilíbrio de sedimentação. A parte de baixo do gráfico apresenta a distribuição de resíduos para o ajuste.

4.8 Ensaios de cristalização para os domínios SEPT2-C e SEPT6-C/SEPT7-C

Os resultados apresentados até agora mostram que os quatro domínios estudados formam dímeros com alto teor de α -hélice e que o hetero-dímero SEPT6-C/SEPT7-C possui forma moderadamente alongada, sendo mais estável e possuindo maior afinidade que os homo-dímeros. Vale ressaltar que os nossos dados são os primeiros dados experimentais a

corroborarem as predições teóricas quanto à formação de *coiled coils* via os domínios C-terminal de septinas humanas.

Contudo, apenas a resolução estrutural a nível atômico é capaz de trazer informações detalhadas para explicar questões de caráter específico, como a especificidade dos domínios, no nosso caso, a maior afinidade dos hetero-dímeros, e função de resíduos particulares. Desta forma, realizamos ensaios de cristalização para os domínios SEPT2-C e SEPT6-C/SEPT7-C. Todos os ensaios de cristalização foram realizados com o robô de cristalização Honey Bee. A tabela 3.3 apresenta os kits utilizados nos respectivos ensaios. Contudo, em nenhum dos caso obtivemos cristal de proteína.

4.9 Ressonância magnética nuclear para o domínio SEPT2-C

Por não necessitar da obtenção de cristais, a estratégia seguinte para a obtenção de informações a nível atômico para os domínios C-terminal de septinas humanas contou com o uso da técnica de Ressonância Magnética Nuclear. Esta etapa do projeto foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Claudia Elisabeth Munte, do Grupo de Biofísica Molecular do IFSC/USP. Por ser o menor, iniciamos as análises com o domínio SEPT2-C. A figura 4.18 apresenta a estrutura primária de SEPT2-C, junto com a numeração dos resíduos.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Gly	Ser	His	Met	Trp	Gly	Arg	Lys	Val	Glu	Asn	Glu	Asp	Met	Asn	Lys	Asp	Gln	Ile	Leu
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Leu	Glu	Lys	Glu	Ala	Glu	Leu	Arg	Arg	Met	Gln	Glu	Met	Ile	Ala	Arg	Met	Gln	Ala	Gln
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	
Met	Gln	Met	Gln	Met	Gln	Gly	Gly	Asp	Gly	Asp	Gly	Gly	Ala	Leu	Gly	His	His	Val	

Figura 4.18 – Estrutura primária para o domínio SEPT2-C, junto com a numeração dos resíduos.

A estratégia inicial para a obtenção do assinalamento e posterior cálculo estrutural baseou-se em medidas de espectros 2D homo-nucleares, TOCSY e NOESY. O espectro NOESY, figura 4.19, apresenta sinais de que a proteína está, pelo menos em parte, enovelada. Vemos vários picos cruzados na região NH-NH, figura 4.20(A), significando proximidade espacial entre prótons amídicos inter-residuais. Entretanto, o espectro TOCSY indica que, embora o domínio seja pequeno (6,7 KDa), a tentativa inicial utilizando tal abordagem não é apropriada: o espectro não apresenta completeza suficiente para a identificação dos sistemas

de spin. A figura 4.20 mostra a região NH-NH dos espectros NOESY e TOCSY, a qual é tipicamente utilizada para o assinalamento seqüencial. Comparando esta região nos dois espectros vemos que vários sistemas de spins presentes no NOESY não são vistos no TOCSY. Por exemplo, a linha tracejada na figura 4.20 indica um sistema de spins presente no NOESY, mas, não observado no TOCSY. Posteriormente, tal sistema foi identificado como sendo devido à lisina número 23, pertencente à parte central do domínio. Tal comportamento (bom espectro NOESY e TOCSY incompleto) é característico de proteínas com peso molecular acima de aproximadamente 10 KDa, assim, esta diferença nos espectros é um indicativo de que SEPT2-C não se comporta de forma monomérica e de que apresenta duas regiões dinamicamente diferentes.

Figura 4.19 – Espectro 2D homo-nuclear NOESY para o domínio SEPT2-C.

Figura 4.20 – Região NH-NH dos espectros NOESY (A) e TOCSY (B). A linha tracejada indica o sistema de spins da lisina número 23, o qual está presente no NOESY, mas, não é observado no TOCSY.

Dado o insucesso na primeira abordagem, partimos para as técnicas de tripla ressonância, com coleta de espectros hetero-nucleares 2D e 3D. O domínio foi então expresso em meio M9, de forma que a única fonte de nitrogênio para as bactérias foi NH_4Cl e a única fonte de carbono foi glicose. Utilizando NH_4Cl com ^{15}N e glicose com ^{13}C , obtivemos o domínio SEPT2-C duplamente marcado com ^{15}N e ^{13}C . Com a amostra duplamente marcada, medimos os espectros ^{15}N -HSQC, ^{13}C -HSQC, HNCA, CBCA(CO)NH e HCCH-TOCSY. Os espectros de tripla ressonância apresentaram um conjunto de picos fortes, que puderam ser

seqüenciados via HNCA e CBCA(CO)NH. Tais picos correspondem aos resíduos das extremidades do domínio. Picos correlacionados foram vistos no espectro ^{15}N -HSQC.

Além dos picos fortes, os espectros de tripla ressonância apresentaram todo um conjunto de picos bem menos intensos e com grande sobreposição, os quais foram atribuídos à região central do peptídeo. O fato de observarmos dois conjuntos de picos (picos fortes e fracos) mais uma vez indica a presença de duas regiões dinamicamente diferente.

Em função da complexidade dos espectros, o tratamento dos dados de RMN foi delegado ao recém chegado ao grupo, o Dr. Edson Crusca Junior, como parte de seu projeto de pós-doutoramento. Desta forma, quase todos os picos pouco intensos foram seqüenciados, também via HNCA e CBCA(CO)NH. A figura 4.21 apresenta o espectro ^{15}N -HSQC do domínio, já com o assinalamento dos picos. A figura 4.22 apresenta o deslocamento químico dos carbonos α em relação aos deslocamentos químicos de *random coil* (68), em função do número do resíduo. Vemos que os resíduos da parte central possuem deslocamentos químicos positivos e elevados, indicando estrutura secundária do tipo α -hélice.

Figura 4.21 – Espectro ^{15}N -HSQC do domínio SEPT2-C, já com o assinalamento dos picos.

Figura 4.22 – Deslocamento químico dos carbonos α em relação aos deslocamentos químicos de *random coil*, em função do número do resíduo. * O resíduo 28 não foi assinalado.

Em paralelo ao tratamento dos dados de RMN realizado pelo Dr. Crusca, optamos por trabalhar com a “parte central” do domínio de SEPT2-C em separado. Para a definição da “parte central” utilizamos, além dos dados de RMN, análises *in silico* dos domínios C-terminal de septinas humanas, como apresentado na próxima seção.

4.10 Análises *in silico* dos domínios C-terminal de septinas humanas

Como apresentado no capítulo 1, septinas humanas são divididas em quatro grupos, figura 1.3. Nesta seção analisaremos a estrutura primária dos domínios C-terminal das septinas dos grupos II, III e IV, ou seja, os três grupos cujas septinas possuem predição de *coiled coil* no domínio C-terminal. Nossas análises foram realizadas com dois programas, CLUSTAL X e COILS, para o alinhamento das sequências e para as predições teóricas, respectivamente. Deve ser salientado que o programa COILS, baseado na estrutura primária, prediz regiões em *coiled coil* e também prediz o tipo de posição de cada resíduo dentro da repetição heptamérica (o que chamamos de fase do *coiled coil*), ou seja, se um dado resíduo ocupa uma posição a, b, c, d, e, f ou g.

Começaremos nossa análise pelo grupo III, o grupo de septinas com domínio C-terminal pequeno (de 61 a 77 resíduos), o qual possui SEPT2 como representante. A figura 4.23 apresenta o alinhamento seqüencial das regiões preditas como *coiled coil* para as septinas do grupo III (nomeadas por 1CC para SEPT1 e assim por diante), junto com a predição de ocupação heptamérica para os resíduos. Os resíduos marcados em amarelo indicam regiões de quebra de fase heptamérica, segundo o programa COILS.

Figura 4.23 – Alinhamento seqüencial das regiões preditas como *coiled coil* para septinas do grupo III. Os resíduos marcados em amarelo indicam quebra de fase heptamérica, segundo o programa COILS. Os resíduos preditos para ocuparem posições d são destacados em azul. A primeira e a última seqüência definem os peptídeos que foram sintetizados, SEPT4-CC e SEPT2-CC, respectivamente.

É importante notar que a região predita como *coiled coil* constitui a parte que possui indícios (deslocamentos químicos dos carbonos α) de estrutura secundária do tipo α -hélice, figura 4.22, e que para 2CC praticamente não há predição de quebra de fase. Os resultados acima nos motivaram a comprar dois peptídeos sintéticos para as regiões em *coiled coil*, referente às proteínas SEPT2 e SEPT4. A figura 4.23 apresenta a definição das duas construções, as quais foram nomeadas por SEPT2-CC e SEPT4-CC.

Passaremos agora para os grupos II e IV, os grupos de septinas com domínio C-terminal longo (de 102 a 184 resíduos). As partes (A) e (B) da figura 4.24 mostram os alinhamentos seqüenciais das regiões preditas como *coiled coil* nos grupos II e IV, respectivamente, junto com a predição de ocupação heptamérica para os resíduos. Novamente, os resíduos marcados em amarelo indicam regiões de quebra de fase. Para o grupo II há predição de três quebras de fase para todas as seqüências, sendo que para as seqüências 6CC, 11CC e 8CC (as maiores) teríamos três regiões (em torno de 25 resíduos) defasadas uma em relação à outra. No caso do grupo IV temos apenas dois representantes,

A figura 4.25 mostra o posicionamento das novas construções, indicadas em cor amarela, dentro dos domínios C-terminal. A figura também apresenta os valores de número de resíduos, peso, PI teórico e absorção em 280 nm para as quatro novas construções.

SEPT2-CC

GRKVENEDM**NKDQILLEKEAELRRMQEMIARMQAQMQM****MQGGDGDGGALGHHV**

30 resíduos

Peso = 3,7 KDa

pI teórico = 6,3

$\epsilon_{280\text{nm}}$ = Não tem W, Y ou C.

SEPT4-CC

KERNRNKLTRESGTDFPIPAVPPGTDPE**TEKLIREKDEELRRMQEMLHKIQQMKENY**

30 resíduos

Peso = 3,8 KDa

pI teórico = 6,9

$\epsilon_{280\text{nm}}$ = Não tem W, Y ou C.

SEPT6-CC

GFKDTPDPSKPFSLQETYEAKRNEFLGELQKKEEEMRQMF**VQRVKEKEAELKEAEKELHEKF**

DRLKKLHQDEKKKLEDKKKSLDDEVNAFKQRKTAALLQSQGSQAGGSQTLKRDKEKKN

59 resíduos

Peso = 7,1 KDa

pI teórico = 8,9

$\epsilon_{280\text{nm}}$ = Não tem W, Y ou C.

SEPT7-CC

TYNGVDNNKNKGQLTKSPLAQMEERREHVAKMKKMEMEMEQVF**EMKVKEKVQKLKDSEAE**

QRRHEQMKNLEAQHKELEEKRRQFEDEKANWEAQQRILEQQNSSRTLEKNKKKGKIF

59 resíduos

Peso = 7,4 KDa

pI teórico = 7.1

$\epsilon_{280\text{nm}}$ = 5500,0 M⁻¹ cm⁻¹

Figura 4.25 – Posicionamento das novas construções, indicadas em cor amarela, dentro dos domínios C-terminal.

Os valores de número de resíduos, peso, pI teórico e absorção em 280 nm são referentes apenas às regiões em amarelo (as novas construções).

4.11 Amplificação e clonagem dos domínios SEPT6-CC e SEPT7-CC

Os cDNAs dos domínios SEPT6-CC e SEPT7-CC foram amplificados através da técnica de PCR, utilizando como molde inicial os cDNAs dos domínios C-terminal clonados anteriormente. O procedimento de clonagem dos dois domínios foi realizado pela técnica especialista em laboratório do grupo de Biofísica Molecular do IFSC/USP Andressa Patrícia Alves Pinto. A figura 4.26 mostra a análise dos produtos de PCR para os dois domínios, realizada em gel de agarosa corado com brometo de etídeo.

Figura 4.26 – Gel de agarosa (0,8%) corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml). 1 - Marcador de pares de bases. 2 - Produto de PCR para SEPT6-CC. 3 - Produto de PCR para SEPT7-CC.

As reações de PCR foram realizadas com sucesso, apresentando o tamanho esperado para os domínios, em torno de 200 bp. O procedimento de clonagem realizado foi idêntico ao apresentado na seção 4.2 para os domínios SEPT6-C e SEPT7-C. Os vetores pET28a(+) contendo os insertos para as construções SEPT6-CC e SEPT7-CC foram nomeados por pET28a-SEPT6-CC e pET28a-SEPT7-CC, respectivamente.

4.12 Expressão e purificação dos domínios SEPT6-CC e SEPT7-CC

Para as expressões dos domínios SEPT6-CC e SEPT7-CC foram usadas cepas de *E. coli* Rosetta(DE3). Após expressão *over night*, à temperatura de 18°C, as células foram centrifugadas, ressuspendidas em tampão A (20 mM Tris, 1M NaCl e pH 7,5), lisadas, centrifugadas novamente e os sobrenadantes foram aplicados em coluna de afinidade de níquel (Ni-NTA). A lavagem da coluna se deu através da passagem do tampão A com gradiente crescente da concentração de imidazol: 25 ml com 10 mM de imidazol, 25 ml com 30 mM de imidazol, 25 ml com 50 mM de imidazol. Até este ponto a purificação das novas construções foi idêntica às purificações dos domínios inteiros. Após a lavagem da coluna os domínios foram eluídos em tampão A com 300 mM de imidazol. A figura 4.27 mostra os géis de Tricina SDS/PAGE (16%) para a primeira parte das purificações.

Figura 4.27 – Géis de Tricina SDS/PAGE (16%) para as purificações de SEPT6-CC (A) e SEPT7-CC (B). Em ambos os géis: 1 - Padrão de massa molecular. 2- Cultura não induzida. 3 - Cultura após indução. 4 - Sobrenadante. 5 - Pellet. 6 - Lavagem da coluna de níquel com 25 ml de tampão A com 50 mM de imidazol. 7 - Eluição em 15 ml de tampão A com 300 mM de imidazol.

Para a retirada do imidazol, as amostras foram dialisadas em tampão A, contudo, a construção SEPT7-CC precipitou durante a diálise. Para a construção SEPT6-CC, após a diálise em tampão A fizemos nova diálise em tampão B (20 mM Tris, 50 mM NaCl e pH 7,5). Contrariamente ao domínio SEPT6-C, a nova construção mostrou-se estável. Neste ponto, trombina protease foi adicionada para a clivagem da cauda. Por fim, a amostra foi novamente aplicada em coluna de afinidade de níquel, em tampão B com 30 mM de imidazol, seguida por aplicação em coluna de benzamidina sefarose, para retirada do *His-tag* clivado e da trombina protease, respectivamente. A figura 4.28 mostra o gel de Tricina SDS/PAGE (16%) da amostra após eluição da coluna de níquel e após a passagem pela coluna de benzamidina. Concentramos a amostra a mais de 1 mM, sem sinais de precipitação.

Figura 4.28 – Gel de Tricina SDS/PAGE (16%) para SEPT6-CC. 1 - Padrão de massa molecular. 2 – Amostra após eluição da coluna de níquel. 3 - Amostra após passagem pela coluna de benzamidina.

A segunda tentativa de obtenção de SEPT7-CC foi realizada de forma quase idêntica à anterior, apenas trocando o tampão A pelo tampão C (20 mM Borato de sódio, 1 M NaCl e pH 10,5). Desta forma, conseguimos purificar e retirar o imidazol. Como o hetero dímero SEPT6-C/SEPT7-C é mais estável que os domínios individualmente, imaginamos que ao misturar SEPT6-CC com SEPT7-CC obteríamos um hetero dímero, possivelmente ainda mais

estável que o hetero dímero dos domínios inteiros. Desta forma, com a finalidade de juntar com SEPT7-CC, fizemos uma nova purificação do domínio SEPT6-CC, desta vez em tampão C.

Como a construção SEPT6-CC não possui nem triptofano nem tirosina, não pudemos usar a quantificação via absorção em 280 nm, assim, optamos por quantificar as novas construções via o método de Bradford. Desta forma, quantificamos as duas amostras, misturamos de forma a obtermos concentração equimolar (50 μ M) para os domínios e, por fim, colocamos para dialisar em tampão B. Contudo, após algumas horas de diálise observamos a formação de precipitado.

Como o domínio SEPT6-CC mostrou-se estável e como não conseguimos obter um hetero dímero para as novas construções, optamos por continuar os estudos apenas com a construção SEPT6-CC. Desta forma, esperamos confirmar, ou não, nossa hipótese inicial da existência de quebra de fase para o *coiled coil* e, possivelmente, planejar novas construções, mais apropriadas para estudar o hetero dímero.

4.13 Espectroscopia de dicroísmo circular para as novas construções

Utilizamos a espectroscopia de dicroísmo circular para caracterizar as novas construções. A figura 4.29 apresenta os espectros de CD para as três novas construções, medidos à temperatura de 4 °C, junto com suas respectivas curvas de desnaturação e renaturação. Assim como para os domínios inteiros, os espectros das novas construções são caracterizados pela presença de dois mínimos em torno de 208 e 222 nm, um indicativo de máximo próximo a 195 nm e por apresentarem intensidade nula próximo a 200 nm, indicando a presença de α -hélice, como esperado.

continua

continuação

Figura 4.29 – Espectros de CD, medidos a 4 °C, e curvas de desnaturação e renaturação para as novas construções. (A) SEPT2-CC, (B) SEPT4-CC e (C) SEPT6-CC.

Novamente, os espectros de CD foram analisados com o pacote CDPro. Para o peptídeo SEPT2-CC a estimativa foi de 55% – 65% de estrutura secundária do tipo α -hélice e menos de 10% de fita β . Para SEPT4-CC a estimativa foi de 40% – 45% de α -hélice e 5% – 15% de fita β . Comparando com a estimativa para SEPT2-C (40 – 50% de α -hélice), vemos que a construção SEPT2-CC possui maior porcentagem de α -hélice do que o domínio inteiro. Contudo, a estimativa para SEPT2-C indica pouco menos de 30 resíduos em α -hélice. Aliado aos dados de RMN e de predição de estrutura secundária (programa COILS), esperaríamos próximo a 100% de estrutura do tipo α -hélice para SEPT2-CC. Desta forma, nossos resultados indicam que embora seja predominantemente a parte central que esteja estruturada, os outros resíduos são importantes para estabilizar a estrutura da região central do domínio. O mesmo efeito é observado para a construção SEPT6-CC, a qual possui estimativa de 20% – 30% para ambas as classes de estrutura secundária. Outro ponto importante a ser notado é que a quantificação para os peptídeos foi feita pesando-se sua massa seca em uma balança analítica, o que pode acarretar erros apreciáveis na quantificação, principalmente devido à hidratação.

Quanto às transições de fase, temos que todas são reversíveis. Contudo, devido à ausência das linhas de base, não podemos obter uma temperatura de transição, T_m , a partir do ajuste dos dados em um dado modelo, como feito na secção 4.5. Ao invés disto,

determinamos a temperatura onde, em média, 50% das moléculas estão estruturadas, $f_D = 0,5$, a qual chamaremos $T_{\text{média}}$. A tabela 4.3 apresenta os valores de $T_{\text{média}}$ para as três construções. Por exemplo, vemos que a construção SEPT6-CC ($T_{\text{média}} = 19\text{ }^{\circ}\text{C}$) é bem menos estável termicamente do que SEPT6-C ($T_m = 33,9\text{ }^{\circ}\text{C}$), sendo mais um indicativo de que os resíduos fora das regiões centrais devem ajudar a estabilizar tais regiões no contexto do domínio como um todo.

Tabela 4.3 – Valores de temperatura onde $f_D = 0,5$, $T_{\text{média}}$, para as três construções.

Construção	$T_{\text{média}}$ ($^{\circ}\text{C}$)
SEPT2-CC	42
SEPT4-CC	33
SEPT6-CC	19

4.14 Ensaios de cristalização para as novas construções

Assim como para os domínios inteiros, todos os ensaios iniciais de cristalização para as novas construções foram realizados com o robô de cristalização *Honey Bee*. As construções SEPT2-CC e SEPT4-CC, os peptídeos sintéticos, foram solubilizadas em solução de 50 mM NaCl, ao passo que a construção SEPT6-CC foi purificada em tampão B (20 mM Tris, 50 mM NaCl e pH 7,5). A tabela 3.4 apresenta os kits utilizados nos ensaios iniciais.

Para a construção SEPT2-CC não obtivemos cristais, ao passo que para SEPT4-CC obtivemos pequenos cristais em forma de agulha para a condição 10 mM Sulfato de Zinco, 100 mM Mes (pH 6,5) e 25% PEG-550 MME (PEGs II), figura 4.30(A) e (B). Refinando a condição acima, a melhor condição que chegamos foi 7 mM Sulfato de Zinco, 100 mM Bis-Tris (pH 6,4) e 25% PEG 500 MME, sendo a concentração protéica de 10 mg/ml, figura 4.30(C) e (D). Observamos que a presença de Sulfato de Zinco foi fundamental para o processo de cristalização, sem ele não obtemos cristais. Então, realizamos também ensaios de cristalização substituindo o Sulfato de Zinco por Sulfato de Cobre, Cloreto de Zinco e Cloreto de Magnésio, contudo, em nenhuma das substituições obtivemos cristais.

Figura 4.30 – Cristais para SEPT4-CC. (A) e (B) Cristais obtidos no *screening* inicial. (C) e (D) Cristais obtidos após refinamento da condição inicial.

Dada a importância do Sulfato de Zinco para o processo de cristalização, realizamos outro *screening* robótico, desta vez acrescentando 7 mM de Sulfato de Zinco à solução protéica, tabela 3.5. Desta forma, obtivemos cristais para SEPT4-CC em várias outras condições. Para o kit PEGs as condições foram: i-) 20 % PEG 3350 e 0,2 M fluoreto de sódio (condição E1). ii-) 20 % PEG 3350 e 0,2 M fluoreto de potássio (condição E2). iii-) 20 % PEG 3350 e 0,2 M formato de sódio (condição F9). iv-) 20 % PEG 3350 e 0,2 M formato de potássio (condição F10). v-) 20 % PEG 3350 e 0,2 M formato de amônio (condição F11). Para o kit PEGs II as condições foram: i-) 0,1 M Mes (pH 6,5) e 15 % PEG 400 (condição A2). ii-) 0,1 M Mes (pH 6,5), 0,2 M cloreto de magnésio e 10% PEG 4000 (condição C4). Desta vez, obtivemos pequenos cristais para SEPT2-CC em duas condições do kit PEGs: i-) 0,2 M de Tiocianato de Sódio e 20 % PEG 3350 (condição F1), figura 4.31(A). ii-) 0,2 M de Tiocianato de Potássio e 20 % PEG 3350 (condição F2), figura 4.31(B). Refinando as condições para SEPT2-CC, o melhor resultado que chegamos foi 0,1 M Tris (pH 9,1), 0,2 M de Tiocianato de Sódio, 15 % PEG 3350 e 7 mM Sulfato de Zinco, fig. 4.31(C) e (D).

Figura 4.31 – Cristais para SEPT2-CC. (A) e (B) Cristais obtidos no *screening* inicial. (C) e (D) Cristais obtidos após refinamento da condição inicial.

Por fim, para a construção SEPT6-CC obtivemos cristais para a condição 100 mM de ácido cítrico (pH 3,5) e 2 M de sulfato de amônio (condição A1 do kit *Classics II*), figura 4.32(A) e (B). Refinando a condição acima, a melhor condição que chegamos foi 100 mM de ácido cítrico (pH 3,5) e 1,5 M de sulfato de amônio, figura 4.32(C) e (D). Também para esta construção tentamos a adição de Sulfato de Zinco, porém, a amostra precipitou imediatamente após a colocação do reagente.

Figura 4.32 – Cristais para SEPT6-CC. (A) e (B) Cristais obtidos no *screening* inicial. (C) e (D) Cristais obtidos após refinamento da condição inicial.

4.15 Coletas de dados no LNLS e processamentos para os melhores cristais obtidos

Montamos em *cryoloops*, congelamos em nitrogênio líquido e coletamos dados de difração de raios X na linha MX2 do LNLS para os cristais obtidos para as três construções mencionadas na seção anterior. Os melhores resultados obtidos foram:

- SEPT2-CC, um conjunto de 209 imagens com resolução em torno de 2,6 Å, com três minutos de exposição por imagem;
- SEPT4-CC, algumas imagens com resolução em torno de 3 Å;
- SEPT6-CC, algumas imagens com resolução em torno de 6 Å.

A figura 4.33 apresenta um *frame* de difração típico para o melhor cristal obtido para cada uma das construções.

Figura 4.33 – Padrões de difração para os cristais das construções SEPT2-CC (A), SEPT4-CC (B) e SEPT6-CC (C), coletado na linha MX2 do LNLS.

Para a redução dos dados de SEPT2-CC utilizamos o programa iMosflm e Scala, acessíveis no pacote CCP4. Observamos queda na intensidade da radiação espalhada com o passar do tempo de coleta, assim, para o processamento utilizamos apenas as primeiras 150 imagens. A tabela 4.4 apresenta os parâmetros de coleta e processamento dos dados. Após esta etapa, identificamos dois possíveis grupos espaciais: $P4_122$ e $P4_322$, os quais são indistinguíveis analisando apenas o padrão de difração. A tabela 4.5 apresenta a porcentagem de solvente e o coeficiente de Matthews em função do número de cadeias polipeptídica na unidade assimétrica. Da tabela, vemos que não é possível a determinação do número de moléculas na unidade assimétrica, uma vez que as estimativas da porcentagem de solvente no cristal são fisicamente aceitáveis para várias opções de população de moléculas na unidade assimétrica.

Tabela 4.4 – Parâmetros de coleta e processamento do cristal de SEPT2-CC, coletado na linha MX2 do LNLS.

Construção	SEPT2-CC
Detector	marmosaic 225
Dimensões da cela (Å)	a=52,56, b=52,56 e c=195,46
Ângulos da cela (°)	$\alpha=90,00$, $\beta=90,00$ e $\gamma=90,00$
Resolução (Å)	45,00-2,60 (2,76-2,60)
Mosaicidade (°)	0,124
Grupo espacial	P4 ₁ 22 ou P4 ₃ 22
Fonte de raios-X	W01B-MX2
λ (Å)	1,605
Número de imagens processadas	150
Rotação por imagem (°)	1
Multiplicidade	11,1 (11,0)
R _{meas} (%)	10,9 (83,1)
Completeza (%)	99,7 (99,8)
Número de reflexões	101837 (16025)
Número de reflexões únicas	9115 (1427)
I/σ	16,34 (3,37)

Tabela 4.5 – Valores do coeficiente de Matthews para o cristal de SEPT2-CC. Percebe-se a indeterminação do número de moléculas na unidade assimétrica, dependendo da proporção de solvente.

Nº Mol./unidade assim.	Coef. de Matthews	% de Solvente
4	4,56	73,02
5	3,65	66,28
6	3,04	59,53
7	2,60	52,79
8	2,28	46,04
9	2,03	39,30
10	1,82	32,56
11	1,66	25,81

Tentamos resolver a estrutura de SEPT2-CC via substituição molecular utilizando o programa Phaser, acessível no pacote CCP4. Como modelo de busca, criamos várias cadeias poli-alanina (de tamanhos diferentes) a partir do *coiled coil* paralelo homo dimérico GCN4-p1. Executamos o programa para os dois possíveis grupos espaciais, P4₁22 e P4₃22, procurando de duas a cinco cópias do modelo de busca na unidade assimétrica. Em alguns casos, o programa retornou possíveis soluções, sempre com *z-score* abaixo de 6. Tentamos refinar algumas das possíveis soluções com o programa Phenix, contudo, em nenhum dos casos conseguimos convergência para o refinamento, por exemplo, os fatores R ficaram sempre acima de 45%.

Como segunda tentativa, utilizamos o programa Modeller para gerar dezenas de modelos de *coiled coils* paralelos e diméricos para servir como modelo de busca. Os modelos gerados variavam em ângulos de empacotamento para as duas hélices, comprimento da cadeia (de 22 a 30 resíduos de aminoácido), fase do *coiled coil* e quantidade e tipo de cadeias laterais “cortadas”. Também neste caso executamos o programa Phaser nos dois possíveis grupos espaciais e buscando de duas a cinco cópias na unidade assimétrica. Contudo, novamente não conseguimos nenhuma solução correta.

4.16 Coletas de dados no ESRF e processamentos para os melhores cristais obtidos

Para os cristais de SEPT2-CC e SEPT4-CC também realizamos coletas de dados na linha ID29 do ESRF. Tais coletas foram realizadas pelos Dr.s’ Humberto D’Muniz Pereira e Marcos Vicente de Albuquerque Salles Navarro, pesquisadores do grupo. A figura 4.34 mostra um cristal de SEPT2-CC (A) e um cristal de SEPT4-CC (B), montados em *cryoloops* e prontos para a coleta.

Figura 4.34 – Cristais de SEPT2-CC (A) e SEPT4-CC (B), montados em *cryoloops* e prontos para a coleta.

Dada a elevada fração de metioninas nas duas construções, 16,7% para SEPT2-CC e 10% para SEPT4-CC, figura 4.25, optamos por medir um conjunto para cada cristal em comprimento de onda próximo à borda de absorção do enxofre, $\lambda = 2,066 \text{ \AA}$, para tentar utilizar o espalhamento anômalo desse átomo para a resolução estrutural. Porém, devido à

baixa qualidade dos cristais, os quais difrataram a 2,5 Å para SEPT2-CC e 2,7 Å para SEPT4-CC, não observamos sinal anômalo apreciável nos conjuntos.

A tabela 4.6 apresenta os parâmetros das coletas e processamentos dos dados dos melhores cristais de SEPT2-CC e SEPT4-CC, coletados no ESRF. Nos dois casos, as coletas foram realizadas com $\lambda = 0,976$ Å, fora da borda de absorção do enxofre. Para a redução dos dados utilizamos o programa XDS. É interessante notar que o cristal SEPT2-CC possui uma cela unitária bem maior do que o cristal de SEPT4-CC. Para SEPT4-CC o coeficiente de Matthews (2,12) indica a presença de apenas uma cadeia polipeptídica na unidade assimétrica, com 42,1% de solvente.

Tabela 4.6 – Parâmetros de coleta e processamento dos dados de SEPT2-CC e SEPT4-CC, coletados na linha ID29 do ESRF.

Construção	SEPT2-CC	SEPT4-CC
Detector	PILATUS 6M	PILATUS 6M
Dimensões da cela (Å)	a=52,67, b=52,67 e c=195,81	a=45,99, b=49,18 e c=28,53
Ângulos da cela (°)	$\alpha=90,00$, $\beta=90,00$ e $\gamma=90,00$	$\alpha=90,00$, $\beta=90,00$ e $\gamma=90,00$
Resolução (Å)	50,00-2,49 (2,65-2,49)	50,00-2,70 (2,86-2,70)
Mosaicidade (°)	0,103	0,169
Grupo espacial	P4 ₁ 22 ou P4 ₃ 22	C222 ₁
Fonte de raios-X	ID29-ESRF	ID29-ESRF
λ (Å)	0,976	0,976
Número de imagens processadas	600	1000
Rotação por imagem (°)	0,15	0,3
Multiplicidade	3,3 (3,1)	5,7 (5,6)
R _{meas} (%)	10,3 (80,8)	12,7 (29,2)
Completeza (%)	96,6 (92,7)	96,4 (90,0)
Número de reflexões	58908 (8723)	9561 (1411)
Número de reflexões únicas	17705 (2752)	1683 (252)
I/ σ	11,61 (2,11)	9,38 (2,97)

Novamente, tentamos resolver a estrutura de SEPT2-CC com o programa Phaser a partir de modelos de *coiled coils* paralelos diméricos gerados com o programa Modeller, mas, como no caso da medida realizada no LNLS, não obtivemos nenhuma solução aparentemente correta. No caso do cristal de SEPT4-CC, uma vez que a unidade assimétrica comporta apenas uma cadeia polipeptídica, pegamos as dezenas de modelos de *coiled coils* utilizados para tentar resolver a estrutura de SEPT2-CC, eliminamos uma das hélices e executamos o programa Phaser nos dois possíveis grupos espaciais para aquele cristal, C222₁ e C222. Desta forma, conseguimos uma possível solução para o grupo C222₁, com *z-score* de 6,3, a qual foi refinada com o programa Phenix e modelada em espaço direto com o programa Coot, chegando a fatores R e R_{livre} de 30,0 e 30,3, respectivamente. Ao utilizar a solução refinada como entrada para o programa Phaser, obtivemos soluções com os seguintes valores de *z-*

score: i- 10,2 para o grupo C222₁ e 5,1 para o grupo C222, indicando fortemente que a solução está correta, sendo o grupo espacial do cristal C222₁. No momento, estamos trabalhando na parte final do refinamento desta solução.

4.17 Análise da estrutura de SEPT4-CC e suas implicações

A construção SEPT4-CC possui 30 resíduos de aminoácidos, sendo que no cristal são “vistos” apenas 28, os dois primeiros não possuem densidade eletrônica. Observamos também três moléculas de água. A figura 4.35 mostra o modelo estrutural, junto com a densidade eletrônica (2Fobs-Fcalc), contornada em 1,3 σ . A cadeia polipeptídica pertencente à unidade assimétrica possui os carbonos representados em amarelo, já as cadeias geradas por simetria cristalográfica possuem os carbonos em cinza. Na parte central da figura, vemos o dímero formado pela cadeia da unidade assimétrica e seu parceiro por simetria cristalográfica de ordem 2.

Figura 4.35 – Modelo estrutural para SEPT4-CC, junto com a densidade eletrônica (2Fobs-Fcalc), contornada em 1,3 σ . A cadeia polipeptídica pertencente à unidade assimétrica possui os carbonos representados em amarelo, já as cadeias geradas por simetria cristalográfica possuem os carbonos em cinza.

O empacotamento cristalino para SEPT4-CC, visto ao longo de duas direções perpendiculares, é mostrado na figura 4.36. É importante notar que não temos *clashes*

cristalinos. Embora tenhamos apenas uma cadeia polipeptídica na unidade assimétrica (uma α -hélice), vemos que esta hélice está formando um *coiled coil* anti-paralelo com uma das simétricas, como destacado em cor diferente na figura, de forma que as duas cadeias são relacionadas por um eixo de simetria cristalográfica de ordem 2. Tal resultado é inesperado, uma vez que a última hélice do domínio GTPase de SEPT2 na estrutura do complexo, figura 1.10, sugere que os domínios C-terminal estariam formando um homo *coiled coil* dimérico e paralelo. Deve ser notado que o fato de observarmos um *coiled coil* anti-paralelo independe do modelo de busca para a substituição molecular, uma vez que a unidade assimétrica comporta apenas uma hélice, sendo a outra gerada por simetria.

Figura 4.36 – Empacotamento cristalino para SEPT4-CC, visto ao longo de duas direções perpendiculares. A hélice da unidade assimétrica (vermelho) forma uma *coiled coil* anti-paralelo e dímero com sua simétrica cristalográfica de ordem 2 (azul).

O ângulo de empacotamento entre as duas hélices do *coiled coil* é positivo e em torno de 20 graus, como esperado para *coiled coils* diméricos, figura 4.37(A). A figura 4.37(B) mostra o alinhamento estrutural entre o *coiled coil* de SEPT4-CC e um *coiled coil* dimérico e anti-paralelo de estrutura já depositada no PDB (código PDB 1T3J).

Figura 4.39 – Empacotamento das cadeias laterais da região de dimerização, visto ao longo de duas direções. Os resíduos nas posições a estão destacados em rosa e os resíduos nas posições d em azul.

As posições das hélices finais dos domínios GTPase no complexo 2/6/7 sugerem que os domínios C-terminal projetam-se perpendicularmente em relação ao eixo do filamento, figura 1.10. A figura 4.40(A) representa tal situação, onde os símbolos + indicam as regiões poli-básicas, responsáveis por interações com a membrana. Neste modelo, a formação de filamentos duplos dar-se-ia através dos domínios C-terminal, como proposto na literatura e indicado na figura 4.40(B), ver também figura 1.14. Neste modelo, os domínios C-terminal possivelmente estariam formando tetrâmeros. Contudo, os resultados de *cross-linking* químico e ultracentrifugação analítica indicam que estes domínios formam apenas dímeros. Outro ponto negativo para este modelo está nas posições das regiões poli-básicas, supondo que vários filamentos interagem simultaneamente com a mesma membrana, as regiões poli-básicas deveriam estar todas voltadas para o mesmo lado, o lado da membrana.

Uma vez que os nossos resultados mostram que a construção SEPT4-CC forma um *coiled coil* dimérico e anti-paralelo, propomos que a formação de filamentos cruzados dar-se-ia via *coiled coils* diméricos e anti-paralelos como indicado na figura 4.40(C). Neste caso, a função dos domínios C-terminal das septinas do grupo III seria a formação de filamentos cruzados. Como existem estudos na literatura indicando que a interação dos domínios C-terminal das septinas 6 e 7 é de tal forma que as duas extremidades ficam próximas (32, 35), possivelmente os hetero *coiled coils* seriam paralelos e desempenhariam papéis diferentes do que os das septinas do grupo III, por exemplo, ajudariam na especificidade das ligações entre septinas ou funcionariam como arcabouço para interações com outras proteínas.

Figura 4.40 – Modelos para o complexo 2/6/7. Os paralelepípedos indicam os domínios NG e os cilindros os domínios C-terminal. + indica as regiões poli-básicas. Cores: SEPT2 (vermelho), SEPT6 (azul) e SEPT7 (amarelo). (A) Domínios C-terminal projetados perpendicularmente em relação ao eixo do filamento. (B) Modelo da literatura para filamentos duplos. (C) Modelo proposto para filamentos cruzados, baseado em *coiled coils* anti-paralelos para o C-terminal de SEPT2.

Resumindo, apresentamos uma nova proposta de como heterofilamentos de septinas poderiam interagir entre si para formar complexos de mais alta ordem, provavelmente essenciais para várias das funções atribuídas às septinas. Deve-se notar que estruturas complexas envolvendo vários filamentos já foram propostas na literatura (69). Contudo, nosso modelo tem as vantagens de:

1. orientar as regiões poli-básicas para o mesmo lado da estrutura, possibilitando que vários filamentos interajam diretamente com a mesma membrana;
2. explicar a dificuldade em encontrar oligômeros maiores do que dímeros para os domínios C-terminal;
3. Utilizar uma interação anti-paralela, como visto na estrutura apresentada neste trabalho, para realizar as ligações cruzadas.

4.18 Cristalização, coleta de dados e processamento para SEPT3-GC

Assim como nos casos anteriores, os ensaios iniciais de cristalização para SEPT3-GC foram realizados com o robô de cristalização *Honey Bee*. A amostra foi purificada em tampão 400 mM NaCl, 25 mM Tris (pH 7,8), 5 mM β -mercaptoetanol, 5 mM $MgCl_2$ e 7% glicerol, pela então aula de doutorado Joci Neuby Alves Macedo, seguindo protocolo padrão (cromatografia de afinidade seguido por exclusão molecular), como descrito em sua tese de doutorado (48). A figura 4.41 mostra a estrutura primária de SEPT3, destacando seus três domínios e a região poli-básica. Vale lembrar que a construção SEPT3-GC perfaz os domínios GTPase e C-terminal da proteína SEPT3.

MSELVPEPRPKPAVPMKPM**S**IN**S**NLLGYIGIDT**I**EQ**M****R**KK**T**M**K**T**G**FD**F**NIMVVGQ**S**GLG**K**STLVNTLFKSQ**V**SR
KASSWNREEKIPKTVEIKAIGHVIEEGGVKM**K**LTVIDTPGF**G**DQINNENCWEPIEKYINEQY**E**KFLKEEVNIARK
KRIPDTRVHCCLYFISPTGHSLRPLDLEFMK**H**LSKVNIIPVIAKADTMTLEEKSE**F**KQVRKELEVNGIEFY**P**Q
KEFDEDELEDKTENDKIRQESMPFAVVGSDKEYQVNGK**R**VLGRKTPWGIIEVENLN**H**CEFALLRDFVIRTHLQDL**K**
EVTHNIHYET**Y**AKRLNDNGGL**P**VSVDTEESHDS**N**P

Figura 4.41 – Estrutura primária da proteína SEPT3, destacando seus três domínios e a região poli-básica. N-terminal (Vermelho), região poli-básica (Azul), GTPase (Verde) e C-terminal (Rosa).

Os ensaios de cristalização iniciais foram realizados com a proteína na forma *apo*, com adição de 1 mM de GDP e com adição de 1 mM de $GTP\gamma S$ (análogo de hidrólise lenta do GTP, onde o átomo de fósforo γ é substituído por um enxofre), tabela 3.6. Obtivemos

aglomerados de cristais em forma de agulha para a condição 0,2 M formato de magnésio e 20% PEG 33350 (condição F8 do kit PEG I) para a proteína com ou GDT ou GTP γ S, figura 4.42. Refinando a condição acima, a melhor que chegamos foi 0,2 M formato de magnésio, 100 mM Bis-Tris (pH 6,2), 18% PEG 3350 e 5% etileno glicol, sendo a concentração protéica de 2,5 mg/ml, com adição de 1mM de GDP e à temperatura de 18 °C, figura 4.42 (C) e (D). Nesta etapa, os ensaios de cristalização foram realizados manualmente e com o método de gota suspensa. Para os ensaios realizados sem adição de nucleotídeo, a amostra precipitava na gota. Também obtivemos cristais com adição de GTP γ S, mas, neste caso, a qualidade dos cristais era inferior.

Figura 4.42 – Cristais para SEPT3-GC. (A) e (B) Aglomerado de cristais em forma de agulha obtidos no *screening* inicial. (C) e (D) Cristais obtidos após refinamento da condição inicial.

Embora a concentração de proteína utilizada nos ensaios de cristalização fosse baixa (2,5 mg/ml), obtínhamos em algumas horas muitos cristais pequenos. Até, em torno de, 24 horas os cristais apresentavam crescimento com faces visivelmente bem definidas. No entanto, após este período os cristais começavam a crescer com morfologia externa irregular. Para tentar melhorar a qualidade dos cristais realizamos ensaios a 4 °C e utilizamos a técnica de *seeding*. No entanto, os melhores cristais continuaram a ser os obtidos a 18 °C, sem o uso do *seeding*. Para evitar morfologia irregular, congelamos as amostras para coleta em torno de 20 horas após a realização dos ensaios de cristalização.

Devido ao tamanho e qualidade dos cristais obtidos não realizamos nenhuma coleta de dados no Brasil, apenas testamos na linha MX2 do LNLS, para averiguar a qualidade dos mesmos durante o refinamento da condição. Após a otimização da condição, o Dr. Humberto D’Muniz Pereira, pesquisador do grupo, levou alguns dos cristais de SEPT3-GC para coletar na linha ID29 do ESRF. Dos cristais testados, apenas um estava bom o suficiente para ser coletado. Desta forma, conseguimos somente um conjunto de dados para SEPT3-GC, à resolução de 2,9 Å. A figura 4.43 mostra o único cristal de SEPT3-GC que foi coletado, já montado no *cryoloop* e pronto para a coleta. É interessante notar como são pequenas as dimensões do cristal, em torno de 20 µm x 60 µm.

Figura 4.43 – Único cristal de SEPT3-GC que foi coletado, já montado no *cryoloop* e pronto para a coleta. A estimativa das dimensões do cristal é 20 µm x 60 µm.

Para a redução dos dados de SEPT3-GC utilizamos o programa XDS. Para a resolução da estrutura utilizamos o método de substituição molecular implementado no programa Phaser. O modelo de busca foi preparado com o programa *Chainsaw*, pertencente ao pacote

CCP4, a partir da estrutura de SEPT2-G (código PDB 2QNR), resolvida a 2,6 Å. Após esta etapa, a estrutura foi submetida a ciclos de refinamento utilizando-se o programa Phenix e modelada em espaço direto com o programa Coot. A tabela 4.7 apresenta os parâmetros de coleta, processamento e refinamento dos dados do cristal de SEPT3-GC.

Tabela 4.7 – Parâmetros de coleta, processamento e refinamento dos dados do cristal de SEPT3-GC, coletado na linha ID29 do ESRF.

Construção	SEPT3-GC
Detector	PILATUS 6M
Dimensões da cela (Å)	a=52,24, b=150,41 e c=158,00
Ângulos da cela (°)	$\alpha=90$, $\beta=90$ e $\gamma=90$
Resolução (Å)	50,0-2,89 (3,06-2,89)
Mosaicidade (°)	0,12
Grupo espacial	C 2 2 2 ₁
Fonte de raios-X	ID29-ESRF
λ (Å)	0,976
Número de imagens processadas	700
Rotação por imagem (°)	0,2
Multiplicidade	5,0 (5,1)
R _{meas} (%)	13,7 (69,1)
Completeza (%)	98,4 (91,8)
Número de reflexões	71512 (10736)
Número de reflexões únicas	14242 (2109)
I/ σ	11,8 (2,34)
Fator R	27,0
Fator R _{jivre}	28,4

4.19 – Análise da estrutura de SEPT3-GC e suas implicações

O empacotamento cristalino para SEPT3-GC, visto ao longo de duas direções perpendiculares, é mostrado na figura 4.44. É importante notar que a estrutura não apresenta *clashes*. Como no caso das duas estruturas de SEPT2-G, complexada com GDP, também SEPT3-GC, complexada com GDP, forma filamentos no cristal, seguindo as duas mesmas interfaces observadas até então (interface G e interface NC), figura 1.9. Desta forma, fica evidente a importância dos dois tipos de interface, até para septinas do grupo I, das quais não se tinha nenhuma estrutura cristalográfica até então. Como ilustração, destacamos na figura 4.44, em vermelho, um dos filamentos de SEPT3-GC.

Figura 4.44 – Empacotamento cristalino para SEPT3-GC, visto ao longo de duas direções perpendiculares. Um dos filamentos está destacado em vermelho.

A unidade assimétrica da estrutura cristalina de SEPT3-GC é composta por duas cadeias poli-peptídicas, formando um dímero. A figura 4.45 mostra o modelo estrutural, em representação *cartoon*, do dímero de SEPT3-GC, visto ao longo de duas direções. Neste caso, a interface de dimerização é a interface G.

Figura 4.45 – Estrutura de SEPT3-GC, em representação *cartoon*, vista ao longo de duas direções. α -hélices (vermelho), fitas β (amarelo), *loops* (verde) e GDP (azul).

A densidade eletrônica da região do sítio de ligação a nucleotídeo e o modelo estrutural são mostrados na figura 4.46(A). Neste caso, a base do GDP é “ensaduihada” entre as cadeias laterais de uma lisina e de uma arginina. Vemos também que a cadeia lateral do ácido aspártico, pertencente ao motivo G4, está coordenando a base do nucleotídeo. A figura 4.46(B) mostra o posicionamento do GDP no sítio de ligação. O P-loop (amarelo) contorna os fosfatos, posicionando o nucleotídeo no sítio, e o ácido aspártico (vermelho), do motivo G4, coordena a base do nucleotídeo.

Figura 4.46 – Sítio de ligação ao nucleotídeo. (A) Mapa de densidade eletrônica, contornado em $1,3\sigma$, e modelo estrutural. (B) Modelo estrutural do sítio; GDP (azul), P-loop (amarelo), ácido aspártico (vermelho) e o resto da proteína (verde).

Para descrever mais detalhadamente a estrutura de SEPT3-GC, faz-se necessário entender as estruturas previamente reportadas para os complexos de SEPT2-G, com GDP e com GppNHp (análogo de hidrólise lenta do GTP). As principais diferenças entre as estruturas de SEPT2-G, com GDP e GppNHp são:

- *Loop de Switch I* – o qual é estruturado quando SEPT2-G é complexada com GppNHp, mas, desestruturado com GDP, figura 4.47(A);
- *Loop de Switch II* – o qual é estruturado quando SEPT2-G é complexada com GppNHp, mas, desestruturada com GDP, figura 4.47(A);
- Extensão das fitas β – as quais são maiores quando SEPT2-G é complexada com GppNHp do que com GDP, figura 4.47(B);
- Orientação relativa entre as duas subunidades, figura 4.47(C).

Figura 4.47 – Principais diferenças entre SEPT2-G com GDP (azul claro) e com GppHNP (azul escuro). (A) SEPT2-G, com GppHNP, enfatizando as regiões de *Switch* I (vermelho) e *Switch* II (laranja). (B) Comprimento das fitas β para as duas estruturas (ponta da seta rosa). (C) Orientação relativa entre as subunidades. O alinhamento foi realizado em relação às cadeias A (da esquerda) de ambas as estruturas.

A estrutura de SEPT3-GC com GDP apresenta densidade eletrônica para, pelo menos em parte, ambas as regiões de *switch*, figura 4.48(A). No entanto, o *switch* II possui

orientação diferente daquela observada na estrutura de SEPT2-G com GppHNp. Para SEPT3-GC as regiões de *switch* II das duas subunidades estão próximas, de forma que ocorre interação direta entre os *loops*, figura 4.48(A). As extensões das fitas são mais próximas àquelas da estrutura de SEPT2-G com GDP, figura 4.48(B). Porém, a orientação relativa entre as duas subunidades se aproxima mais da estrutura de SEPT2-G com GppNHp, figura 4.48(C).

continua

continuação

Figura 4.48 – Principais diferenças entre SEPT2-G com GDP (azul claro), com GppHNP (azul escuro) e SEPT3-GC com GDP (verde). (A) SEPT3-GC, com GDP, enfatizando as regiões de *Switch* I (vermelho) e *Switch* II (laranja). (B) Comprimento das fitas β para as três estruturas (ponta da seta rosa). (C) Orientação relativa entre as subunidades. O alinhamento foi realizado em relação às cadeias A (da esquerda) das três estruturas.

Atualmente, estamos analisando de forma minuciosa as diferenças entre as estruturas já conhecidas na literatura e a estrutura de SEPT3-GC obtida neste trabalho. Esperamos encontrar diferenças que possam lançar luz quanto à especificidade na montagem de filamentos de septinas humanas e também quanto ao papel do nucleotídeo para a função de tais proteínas. Por fim, citamos o fato de que o filamento formado por SEPT3-GC, com GDP, é mais compacto do que o formado por SEPT2-G, com GDP. A figura 4.49 mostra o alinhamento entre os dois filamentos, sendo que o alinhamento foi realizado com base na terceira sub-unidade (da esquerda para a direita) de cada filamento. Percebe-se claramente o deslocamento existente entre as hélices finais. O fato de um dos filamentos ser mais compacto do que o outro está relacionado à diferença na orientação entre as subunidades, figura 4.48(C).

Figura 4.49 – Alinhamento entre os filamentos de SEPT3-GC (verde) e SEPT2-G (azul claro), ambos com GDP. O alinhamento foi realizado com base na terceira sub-unidade (da esquerda para a direita) de cada filamento.

Deve ser notado que apresentamos aqui a primeira estrutura de uma septina do grupo I, grupo das septinas que possuem a predição de não apresentarem *coiled coil* no domínio C-terminal, figura 1.4. E que o fato de SEPT3-GC formar filamentos no cristal, utilizando as mesmas interfaces já descritas anteriormente, sugere que SEPT3 seja capaz formar heterofilamentos com outras septinas, como proposto recentemente via estudos de duplo híbrido (70). Por fim, o fato de que os *switches* estão parcialmente ordenados e mesmo assim o filamento se forma no cristal sugere que o controle na montagem do filamento e sua relação com a hidrólise de GTP seja mais complexo do que o sugerido por Sirajuddin et al (34). Certamente, há a necessidade de se resolver mais estruturas de hetero complexos para a elucidação da questão da especificidade de septinas humanas.

Capítulo 5

Apanhado geral e perspectivas

The real voyage of discovery consists not in seeking new landscapes, but in having new eyes.”

Marcel Proust

Capítulo 5 Apanhado geral e perspectivas

Dada a inexistência de informações estruturais a nível atômico para os domínios C-terminal de septinas humanas e a baixa qualidade das poucas estruturas cristalográfica existentes de domínios GTPases, propusemos:

- A obtenção de informações bioquímicas e estruturais dos domínios C-terminal de septinas humanas, com destaque para os domínios das septinas envolvidas no complexo 2/6/7;
- A obtenção da estrutura cristalográfica da construção SEPT3-GC, membro do único grupo de septinas humanas para o qual não existe nenhuma estrutura cristalográfica.

Com os objetivos descritos acima em mente, clonamos os domínios C-terminal das proteínas SEPT2, SEPT6 e SEPT7 (SEPT2-C, SEPT6-C e SEPT7-C, respectivamente) em vetor pet28a(+) e expressamos as construções em *E. coli*. Os domínios SEPT2-C e SEPT6-C foram purificados utilizando-se cromatografia de afinidade por níquel, com rendimento de 15 a 20 mg de proteína por litro de cultura. Para a construção SEPT7-C, a cromatografia de afinidade por níquel sozinha não foi suficiente. Após esta etapa, o domínio era acompanhado por contaminantes de baixo peso molecular. Desta forma, utilizamos também um passo de cromatografia de troca iônica. Após esta segunda etapa, SEPT7-C apresentou pureza satisfatória. O rendimento neste caso foi de 2 a 3 mg de proteína por litro de cultura. Em todos os casos, os *His-tags* foram clivados com trombina protease.

Durante as purificações percebemos que os três domínios apresentavam estabilidades diferentes. SEPT2-C era estável a altas concentrações (~10mg/ml), em contra partida, os outros dois precipitavam a concentrações maiores do que 0,5 mg/ml. Ambas as observações valem em tampão com 50 mM de NaCl e pH 7,5. Como existem estudos na literatura que aponta para interação direta entre SEPT6-C e SEPT7-C, misturamos, de forma equimolar, os dois domínios. Neste caso, pudemos concentrar a mistura até ~ 15 mg/ml, sem sinal visível de precipitado. Então passamos a chamar tal mistura de domínio SEPT6-C/SEPT7-C ou complexo SEPT67-C.

Uma vez obtidos os domínios puros, iniciamos suas caracterizações. As primeiras técnicas utilizadas foram filtração em gel e *cross-linking* químico. Os resultados das duas técnicas indicaram que as quatro construções apresentam-se de forma dimérica em solução. A

espectroscopia de dicroísmo circular (CD) indicou elevado conteúdo de estrutura secundária do tipo α -hélice para as construções SEPT6-C, SEPT7-C e SEPT6-C/SEPT7-C e moderado para SEPT2-C. Em todos os casos, as estimativas de fitas beta β foram menores do que 5%. Os ensaios de desnaturação térmica indicaram que SEPT6-C/SEPT7-C é mais estável termicamente do que SEPT6-C e SEPT7-C individualmente. Indicando interação direta entre os domínios.

Usualmente, o estudo de interações proteína-proteína utiliza metodologias complementares para a obtenção de informações sobre o sistema em questão. Com o intuito de quantificar a interação observada entre SEPT6-C e SEPT7-C utilizamos a técnica de ressonância plasmônica de superfície (SPR), obtendo o valor de 15,8 nM para a constante de dissociação do complexo. Também avaliamos as interações de SEPT6-C e SEPT7-C com SEPT2-C. Observamos que tais interações existem, porém com baixa afinidade, sendo as constantes de dissociação da ordem de micro-molar.

Para completar os estudos de SPR, realizamos experimentos de ultracentrifugação analítica com as construções SEPT6-C/SEPT7-C e SEPT2-C. Os dados para o complexo SEPT6-C/SEPT7-C confirmaram a presença de dímeros em solução. No caso de SEPT2-C, observamos equilíbrio monômero/dímero, com constante de dissociação de 4 μ M. Vale ressaltar que em todos os experimentos não observamos a formação de oligômeros de ordem mais alta, como trímeros e tetrâmeros.

Com o intuito de obter informações a nível atômico sobre os domínios, realizamos ensaios de cristalização para as construções SEPT2-C e SEPT6-C/SEPT7-C. Porém, não obtivemos cristais em nenhum dos casos. Por não necessitar da obtenção de cristais, a estratégia seguinte contou com o uso da técnica de ressonância magnética nuclear, RMN. Por ser o menor, iniciamos as análises com a construção SEPT2-C. Os dados de RMN mostraram que o domínio apresenta duas regiões dinamicamente diferentes. Uma região central estruturada em hélice e duas regiões de extremidades, desenoveladas. Tentamos duas estratégias diferentes para a obtenção da estrutura via RMN (espectros 2D homonucleares e espectros 2D e 3D heteronucleares). Porém, devido a dificuldades técnicas, não conseguimos chegar à estrutura. Neste ponto do trabalho, decidimos fazer novas construções.

Análises *in silico* foram realizadas para ajudar na definição das novas construções. Como os dados de RMN indicaram que a parte central de SEPT2-C estava estruturada, compramos um peptídeo sintético para esta região (SEPT2-CC). Alinhando SEPT2-CC com as regiões equivalentes das outras septinas do grupo III, vimos que as outras três sequências são conservadas e, ao mesmo tempo, significativamente diferentes da sequência de SEPT2-

CC. Desta forma, compramos também outro peptídeo sintético, perfazendo a região equivalente de SEPT4 (SEPT4-CC). Para os domínios C-terminal das septinas dos grupos II e IV, nossas análises *in silico* indicaram a presença de regiões de quebra de fase para o *coiled coil*. Especificamente, para SEPT6-C e SEPT7-C, levantamos a hipótese de que a especificidade para o hetero complexo esteja relacionada ao alinhamento das regiões de quebra de fase, como já descrito na literatura para outros *coiled coils*. Assim, desenhamos duas novas construções, SEPT6-CC e SEPT7-CC. Esperávamos que ambas fossem formar homo *coiled coils*, com a presença de uma quebra de fase na região central, e hetero *coiled coils*, também com uma quebra de fase.

As construções SEPT6-CC e SEPT7-CC foram clonadas em vetor de pet28a(+) e expressas em *E. coli*. Ambas as construções foram purificadas por cromatografia de afinidade por níquel. Porém, a construção SEPT7-CC mostrou-se instável em pH neutro. Neste ponto, resolvemos, por hora, trabalhar apenas com a construção SEPT6-CC. Desta forma, esperávamos confirmar, ou não, nossa hipótese inicial da existência de quebra de fase para o *coiled coil* e obter informações que nos ajudassem planejar melhor novas construções, mais apropriadas para estudar o hetero dímero.

Com as novas construções, SEPT2-CC, SEPT6-CC e SEPT7-CC, realizamos medidas de CD. Indicando conteúdo de estrutura α -hélice, porém o conteúdo estimado estava abaixo do esperado a partir dos estudos de CD dos domínios inteiros. Indicando que embora as regiões centrais estejam estruturadas nos domínios, os outros resíduos são importantes para manter a estabilidade do domínio como um todo. Realizamos também ensaios de cristalização para as novas construções e obtivemos cristais para os três domínios. Até o momento, não conseguimos cristais de qualidade satisfatória para SEPT6-CC. Assim, coletamos conjuntos de dados apenas para SEPT2-CC e SEPT4-CC.

Dos dois, até o momento, resolvemos apenas a estrutura do cristal de SEPT4-CC. Contrariamente do imaginado, vimos que tal construção forma um *coiled coil* anti-paralelo. Analisamos a estrutura obtida e vimos que ela não apresenta *clashes* cristalinos e que o empacotamento para as cadeias laterais dos resíduos pertencentes à região de dimerização estão coerentes com os dados da literatura para *coiled coils* anti-paralelos, empacotamento dos resíduos em posições a de uma hélice contra resíduos em posições d da outra hélice. Ainda estamos trabalhando para melhorar o refinamento da estrutura, contudo, vemos que os fatores R estão convergindo, como seria de se esperar. Baseados em tal estrutura propomos um modelo para a formação de ligações cruzadas entre filamentos de septinas humanas.

Atualmente, estamos trabalhando para resolver a estrutura de SEPT2-CC. Compraremos outro peptídeo para SEPT2-CC, desta vez substituindo uma das metioninas por seleno-metionina, para usar o espalhamento anômalo do selênio para a obtenção experimental das fases. O que possibilitaria a resolução de sua estrutura. Com relação a SEPT6-CC, estamos otimizando o cristal obtido. Por fim, estamos planejando novos peptídeos sintéticos para partes diferentes dos domínios SEPT6-C e SEPT7-C. Esperamos que com a continuidade do projeto consigamos o detalhamento, a nível atômico, dos domínios em estudo, para então respondermos as questões relacionadas à especificidade dos *coiled coils* de septinas humanas e de suas funções no contexto da montagem dos filamentos.

Para a construção SEPT3-GC, realizamos vários ensaios de cristalização. Obtivemos pequenos cristais para a construção em sua forma complexada, tanto com GDP quanto com GTP γ S, sendo que os cristais do segundo caso eram de pior qualidade. Para a forma complexada com GDP, coletamos apenas um conjunto de dados, na linha ID29 do ESRF, o qual foi processado a 2,9 Å. Com este conjunto, resolvemos a estrutura de SEPT3-GC, via substituição molecular. Analisamos a estrutura obtida e vimos que ela não apresenta *clashes* cristalinos e que SEPT3-GC forma filamentos no cristal, utilizando as mesmas interfaces já descritas anteriormente para outras septinas. Tal resultado sugere que SEPT3 seja capaz de formar hetero filamentos com outras septinas, como proposto recentemente via estudos de duplo híbrido.

Comparamos, em termos globais, a estrutura apresentada aqui com duas estruturas de SEPT2-G já conhecidas na literatura, uma complexada com GDP e outra complexada com GppHNp. Atualmente, estamos analisando de forma minuciosa as diferenças entre as estruturas já conhecidas na literatura e a estrutura de SEPT3-GC. Esperamos encontrar diferenças que possam lançar luz quanto à especificidade na montagem de filamentos de septinas humanas e também quanto ao papel do nucleotídeo para a função de tais proteínas. Continuaremos nossos esforços de obtenção de cristais de qualidade satisfatória para SEPT3-GC complexada com GTP γ S. Deve ser notado que a estrutura apresentada aqui é a primeira estrutura de uma septina do grupo I, grupo das septinas que possuem a predição de não apresentarem *coiled coil* no domínio C-terminal.

Referências

- 1 HARTWELL, L. H. et al. Genetic control of the cell division cycle in yeast. **Science**, v. 183, n. 4120, p. 46-51, 1974
- 2 HARTWELL, L. H. Genetic control of the cell division cycle in yeast: IV genes controlling bud emergence and cytokinesis. **Experimental cell research**, v. 69, n. 2, p. 265-276, 1971
- 3 FARES, H. et al. Identification of a developmentally regulated septin and involvement of the septins in spore formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of cell biology**, v. 132, n.3, p. 399-411, 1996
- 4 BYERS, B.; GOETSCH, L. A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. **The journal of cell biology**, v. 69, n.2, p. 717-721, 1976
- 5 KARTMANN, B.; ROTH, D. Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis. **Journal of cell science**, v. 114, n 5, p. 839-844, 2001
- 6 NEUFELD, T. P.; RUBIN, G. M. The drosophila peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament protein. **Cell**, v. 77, n.3, p. 371-379, 1994
- 7 CAO, L. et al. Phylogenetic and evolutionary analysis of the septin protein family in metazoan. **FEBS letters**, v. 581, n. 28, p. 5526-5532, 2007
- 8 MACARA, I. G. et al. Mammalian septin nomenclature. **Molecular biology of the cell**, v. 13, n. 12, p. 4111-4113, 2002
- 9 BOURNE, H. R. et al. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. **Nature**, v. 349, p. 117-127, 1991
- 10 ZHANG, J. et al. Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. **Current biology**, v. 9, n.24, p. 1458-1467, 1999
- 11 MARTÍZES, C. et al. Human septin-septin interactions as a prerequisite for targeting septin complexes in the cytosol. **Biochemistry journal**, v. 382, n. 382, p. 783-791, 2004

- 12 CAO, L. et al. The evolution, complex structures and function of septin proteins. **Cellular and molecular life sciences**, v. 66, n. 20, p. 3309-3323, 2009
- 13 BI, E. et al. Involvement of an actomyosin contractile ring in cytokinesis. **The journal cell biology**, v. 142, n.5, p. 1301-1312, 1998
- 14 NGUYEN, T. Q. et al. The *C. elegans* septin genes, *unc-59* and *unc-61*, are required for normal postembryonic cytokineses and morphogenesis but have no essential function in embryogenesis. **Journal of cell science**, v. 113, n. 21, p. 3825-3837, 2000
- 15 HALL, P. A.; RUSSEL, S. E. H. The pathobiology of the septin gene family. **Journal of pathology**, v. 204, n. 4, p. 489-505, 2004
- 16 SPILIOTIS, E. T. Regulation of microtubule organization and functions by septin GTPases. **Cytoskeleton**, v. 67, n.6, p. 339-345, 2010
- 17 PETERSON, E. A.; PETTY, E. M. Conquering the complex world of human septins: implications for health and disease. **Clinical genetics**, v. 77, n.6, p. 511-524, 2010
- 18 KATO, Y. et al. Overexpression of Septin 1: possible contribution to the development of oral cancer. **International journal of oncology**, v. 31, p. 1021-1028, 2007
- 19 RUSSEL, S. E. H.; HALL, P. A. Do septins have a hole in cancer ? **British journal of Cancer**, v. 93, p. 499-503, 2005
- 20 TANAKA, M. 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, p. 483-488, 2002
- 21 KINOSHITA, M. et al. Identification of septins in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. **American Journal of Pathology**, v. 153, p. 1551-1560, 1998
- 22 MOSTOWY, S. et al. Septins regulate bacterial entry into host cells. **PLosOne**, V. 4, n. 1, p. 1-11, 2009
- 23 IHARA, M. et al. Association of the cytoskeletal GTP-binding protein sept4/H5 with cytoplasmic inclusions found in Parkinson's disease and other synucleinopathies. **The journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 26, p. 24095-24102, 2003

- 24 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

- 25 FIELD, C. M. et al. A purified *Drosophila* septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity. **The journal of cell biology**, v. 133, n. 3, p. 605-616, 1996

- 26 HSU, S. 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

- 27 JOBERTY, G. et al. Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. **Nature cell biology**, v. 3, p. 861-866, 2001

- 28 SHEFFIELD, P. J. et al. Borg/Septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments. **The journal of biological chemistry**, v. 278, p. 3483-3488, 2003

- 29 KINOSHITA, M. Assembly of mammalian septins. **Journal of biochemistry**, v. 134, n.4, p. 491-496, 2003

- 30 LUKOYANOVA, N. et al. 3D Reconstruction of mammalian septin filaments. **Journal of molecular biology**, v. 376, n. 1, p. 1-7, 2008

- 31 NAGATA, K. et al. Biochemical and cell biological analyses of a mammalian septin complex, sept7/9b/11. **The journal of biological chemistry**, v. 279, p. 55895-55904, 2004

- 32 LOW, C.; MACARA, I. G. Structural analysis of septin 2, 6 and 7 complexes. **The journal of biological chemistry**, v. 281, n. 41, p. 30697-30706, 2006

- 33 SIRAJUDDIN, M. et al. Structural insight into filament formation by mammalian septins. **Nature**, v. 449, p. 311-315, 2007

- 34 SIRAJUDDIN, M. et al. GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n 39, p. 16592-16597, 2009

- 35 JOHN, C. M. et al. The *Caenorhabditis elegans* septin complex is nonpolar. **The EMBO journal**, v. 26, 3296-3307, 2007

- 36 BERTIN, A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 8174-8279, 2008
- 37 LUPAS, A. N.; GRUBER, M. The structure of alpha-helical coiled coils. **Advances in Protein Chemistry**, v. 70, p. 37-78, 2005
- 38 CRICK, F. H. C. Is the alpha-keratin a coiled-coil ? **Nature**, v. 170, p. 882-883, 1952
- 39 PAULING, L.; COREY, R. B.; BRANSON, H. R. The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. **Chemistry**, v. 37, p. 205-211, 1951
- 40 TESTA, O. D.; MOUTEVELIS, E.; WOOLFSON D. N. CC+: a relational database of coiled-coil structures. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D315-D322, 2009
- 41 SODEK, J. et al. Amino-acid sequence of rabbit skeletal tropomyosin and its coiled-coil structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 69, n. 12, p. 3800-3804, 1972
- 42 BROWN, J. H. et al. Heptad breaks in alpha-helical coiled coils: stutters and stammers. **Proteins: structure, function, and genetics**, v. 26, p. 134-145, 1996
- 43 O'SHEA, E. K. et al. X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. **Science**, v. 254, n. 5031, p. 539-544, 1991
- 44 HARBURY, P. B. et al. A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants. **Science**, v. 262, n. 5138, p. 1401-1406, 1993
- 45 GONZALEZ Jr., L.; WOOLFSON, D. N.; ALBER T. Buried polar residues and structural specificity in the GCN4 leucine zipper. **Nature Structural Biology**, v. 3, p. 1011-1018, 1996
- 46 SILVA, W. G. J. **Estudos estruturais e bioquímicos das septinas humanas bradeiona α e β** . 2005. 136 p. Tese (Doutorado em Física - Biomolecular) Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005
- 47 ALESSANDRO, F. **Estudos estruturais e bioquímicos das septinas 7 e 9 humanas**. 2010. 144 p. Tese (Doutorado em Física - Biomolecular) Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010

48 MACEDO, J. N. A. **Estudos estruturais e funcionais de septinas humanas: a ligação e hidrólise de GTP por SEPT3 e a busca de parceiros funcionais de SEPT1, SEPT5 e SEPT7**. 2010. 161 p. Tese (Doutorado em Física - Biomolecular) Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010

49 GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876-2890, 2006

50 SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252-260, 2000

51 RALSTON, G. **Introduction to analytical ultracentrifugation**. California, EUA, Department of biochemistry: University of Sydney, 1993, v. 1. (Beckman instruments).

52 SCHUCK, P. et al. Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and applications to model systems. **Biophysical Journal**, v. 82, n. 2, p. 1096-111, 2002

53 LIU, J.; ANDYA, J. D.; SHIRE, S. J. A critical review of analytical ultracentrifugation and field flow fractionation methods for measuring protein aggregation. **The AAPS Journal**, v. 8, n. 3, p. E580-E589, 2005

54 COLE, J. L. Analysis of heterogeneous interactions. **Methods in Enzymology**, v. 384, p. 212-232, 2004

55 LESLIE, A. G. The integration of macromolecular diffraction data. **Acta Crystallographica section D – biological crystallography**, v. 62, 48-57, 2006

56 EVANS, P. Scaling and assessment of data quality. **Acta Crystallographica section D – biological crystallography**, v. 62, 72-82, 2006

57 WOLFGANG, K. XDS. **Acta Crystallographica section D – biological crystallography**, v. 66, p. 125-132, 2010

58 MCCOY, A. J. Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser. **Acta Crystallographica section D – biological crystallography**, v. 63, p. 32-41, 2007

- 59 MARTÍ-RENOM, M. A. et al. Comparative protein structure modeling of gene and genomes. **Annual Review Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 29, p. 291-325, 2000
- 60 ADAMS, P. D. et al. Phenix: buiding new software for automated crystallographic structure determination. **Acta Crystallographica section D – biological crystallography**, v. 58, 1948-1954, 2002
- 61 EMSLEY, P. and COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica section D – biological crystallography**, v. 60, 2126-2132, 2004
- 62 LI, M. X. et al. Structure determination by NMR: isotope labeling. **Methods in Molecular Biology**, v. 173, n 3, p. 255-265, 2002
- 63 WUTHRICH, K. **NMR of proteins and nucleic acids**. New York: Wiley, 1998
- 64 MARKLEY, J. L. et al. Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 1, p. 117-142, 1998
- 65 LARKIN, M. A. et al. Clustal W and clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007
- 66 LUPAS, A.; DYKE, M. V.; STOCK, J. Predicting coiled coil from protein sequences. **Science**, v. 252, n. 5009, p. 1162-1164, 1991
- 67 RICH, R. L.; MYSZKA, D. G. Survey of the year 2006 commercial biosensor literature. **Journal of Molecular Recognition**, v. 20, n. 5, p. 300-366, 2007
- 68 WISHART, D. S. et al. ^1H , ^{13}C and ^{15}N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 5, n. 1, p. 67-81, 1995
- 69 BERTIN, A. et al. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate promotes budding yeast filament assembly and organization. **Journal of Molecular Biology**, 2010. In press
- 70 NAKAHIRA, M. et at. A draft of the human septin interactome. **PlosOne**, v. 5, n. 11, p. e13799, 2010

71 MORAN, M. et al. Neglected disease research and development: how much are we really spending? **Plos Medicinal**, v. 6, n. 2, p. 137-146, 2009

72 DZEJA, P.; TERZIC, A. Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 4, p. 1729-1772, 2009

Apêndice A Estudos estruturais de adenilato quinases de *Schistosoma mansoni*

Doenças parasitárias são uma das principais causa de morte em países em desenvolvimento, contudo, recebem pouca ou nenhuma atenção da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novas terapias (71). Neste contexto, o Centro de Biologia Molecular Estrutural (CBME) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP) tem desenvolvido *expertise* no desenvolvimento de compostos ativos contra enzimas alvo de doenças parasitárias.

Em paralelo ao projeto principal, também desenvolvemos estudos estruturais das enzimas adenilato quinases (ADK's) de *Schistosoma mansoni*. Tais enzimas são amplamente distribuídas e catalisam a reação de troca de fosforil na reação $2\text{ADP} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{AMP}$, a qual é crítica no ciclo de vida celular. Devido à propriedade particular da reação catalisada, as ADK's são reconhecidas como repórter do estado energético da célula, traduzindo pequenas alterações no equilíbrio entre a ATP e ADP em uma grande mudança na concentração de AMP (72). A compreensão, a nível atômico, de tais proteínas pode vir a ajudar no desenvolvimento de inibidores específicos ou servir como ferramenta para o desenvolvimento de testes de diagnósticos para a esquistossomose. Esta parte do trabalho foi realizada em colaboração com o Dr. Humberto D'Muniz Pereira.

O genoma de *S. mansoni* foi seqüenciado pelo *Sanger Center* (Inglaterra). Realizamos buscas no genoma recém seqüenciado para as proteínas adenilato quinase e encontramos dois genes. Os produtos dos genes correspondentes foram nomeados por ADK1 (Smp_061940.1, 197 resíduos) e ADK2 (Smp_071390, 239 resíduos), sendo que as duas seqüências possuem identidade de apenas 28%. ADK1 possui 54% de identidade seqüencial quando comparada sua homóloga humana, ao passo que ADK2 possui 50%.

Os cDNAs de ambas as proteínas foram amplificados através da técnica de PCR, sendo então clonados no vetor pET-28a(+), de forma análoga ao descrito na seção 4.2 para os domínios C-terminal das septinas do complexo 2/6/7. Desta forma, as proteínas foram expressas fusionadas a um sítio de clivagem por trombina seguido por uma cauda de seis histidinas. A figura A.1 mostra a análise dos produtos de PCR para ambas as construções, realizada em gel de agarosa, corado com brometo de etídeo.

Figura A.1 – Gel de agarosa (0,8%) corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml). 1 - Marcador de pares de base. 2 - Produto de PCR para ADK1. 3 - Produto de PCR para ADK2.

Os plasmídeos de expressão recombinantes foram usados para transformar cepas de *E. coli* BL21(DE3). Os produtos foram purificados em dois passos: coluna de afinidade de níquel (Ni-NTA) e filtração em gel (coluna Superdex 200, 10/300 Gl, Amersham Biosciences). Para a afinidade de níquel, a lavagem da coluna se deu através da passagem do tampão de re-suspensão (20 mM Tris, 200 mM NaCl e pH 7,4) com gradiente crescente da concentração de imidazol: 25 ml com 10 mM de imidazol, 25 ml com 30 mM de imidazol e 25 ml com 60 mM de imidazol. Após a lavagem da coluna as amostras foram eluídas em tampão de re-suspensão com 300 mM de imidazol, dializadas (para retirada do imidazol), incubadas *over night* com trombina, concentradas e aplicadas em coluna de filtração em gel. A figura A.2 mostra o gel de SDS/PAGE para alguns dos passos do processo de purificação de ADK1.

Figura A.2 – Gel de SDS/PAGE (12%) para ADK1. 1- Padrão de massa molecular. 2 - Sobrenadante. 3 - Pellet. 4 - Lavagem com 25 ml de tampão de re-suspensão com 60 mM de imidazol. 5 - Eluição em 15 ml de tampão de re-suspensão com 300 mM de imidazol. 6 - Após *over night* com trombina. 7 - Amostra após passagem pela coluna de filtração em gel.

Realizamos ensaios robóticos de cristalização para ambas as proteínas, contudo, obtemos cristais apenas para ADK1 (em sua forma *apo*) para a condição 100 mM Tris (pH 8,5) e 2,4 M fosfato de amônio dibásico. Tentamos refinar a condição, mas, a melhor condição continuou sendo a condição inicial. Para os ensaios manuais, os quais foram realizados com gota suspensa, obtivemos gotas com cristais agulhas, figura A.3(A) e (B), e gotas com cristais em forma de barra, figura A.3(C) e (D).

Figura A.3 – Cristais para ADK1. (A) e (B) Cristais em forma de agulha. (C) e (D) Cristais em forma de barra.

Diversos cristais foram montados em *cryo loops* e congelados em nitrogênio líquido, utilizando-se como crioprotetor a solução mãe com 20% de glicerol. Os dados de difração foram coletados na linha MX2 do LNLS, sendo o melhor conjunto de dados processado a 2,05Å. Para a redução dos dados utilizamos os programas iMosflm (55) e Scala (56). Para a resolução da estrutura utilizamos o método de substituição molecular implementado no programa Phaser (58). O modelo de busca utilizando foi gerado com o programa *Chainsaw*, a partir de uma versão truncada da estrutura de adenilato quinase porcina (código PDB 3ADK). Realizamos a construção automática do modelo com o programa ARP/wARP

(<http://www.embl-hamburg.de/ARP/>). Após esta etapa, a estrutura foi submetida a ciclos de refinamento utilizando-se o programa Phenix (60) e modelada em espaço direto com o programa Coot (61). A tabela A.1 mostra os parâmetros de coleta, processamento e refinamento dos dados para a estrutura de ADK1.

Tabela A.1 – Parâmetros de coleta e processamento dos dados para a estrutura de ADK1.

Construção	ADK1
Detector	Marmosaic 225
Dimensões da cela (Å)	a=82,16, b=82,16 e c=66,11
Ângulos da cela (°)	$\alpha=90$, $\beta=90$ e $\gamma=90$
Resolução (Å)	2,05
Mosaicidade (°)	0,4
Grupo espacial	P 4 ₁ 2 ₁ 2
Fonte de raios-X	W01B-MX2
λ (Å)	1,459
Número de imagens processadas	60
Rotação por imagem (°)	1
Multiplicidade	4,5 (4,4)
R _{meas} (%)	10,6 (60,7)
Completeza (%)	99,9 (100,0)
Número de reflexões	65641 (9335)
Número de reflexões únicas	14735 (2116)
I/ σ	11,8 (2,4)
Fator R	18,9
Fator R _{livre}	22,6

A figura A.4 mostra o alinhamento estrutural entre ADK1 de *S. mansoni* e ADK1 humana complexada com AP5 (*Bis(Adenosine)-5'-pentaphosphate*, duas moléculas de ADP unidas covalentemente por um fosfato extra) (código PDB 1Z83). Comparando, em termos globais, as duas estruturas, vemos diferenças nas orientações das hélices próximas ao sítio ativo. Atualmente, estamos analisando de forma minuciosa as diferenças entre a estrutura apresentada aqui e as estruturas de ADK's conhecidas na literatura. Esperamos encontrar diferenças que possam ser utilizadas para o planejamento de novos fármacos.

Testes preliminares de atividade foram realizados, até o momento, apenas para ADK1. Mostrando que a proteína estava cataliticamente ativa. Os testes consistiram na análise direta da presença de AMP e ATP por HPLC (cromatografia de troca aniônica em coluna "Protein Pack DEAE 5PW", Waters), após a incubação de ADK1 com ADP. A figura A.5 mostra o cromatograma da solução 20 mM Tris (pH 7,4), 200 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ e 1 mM ADP, antes e após a incubação com ADK1.

Figura A.4 – Alinhamento estrutural entre ADK1 de *S. monsoni* (em sua forma *apo*, vermelho) e ADK1 humana (complexada com AP5, verde). A molécula de AP5 é mostrada em azul.

Figura A.5 – Testes preliminares de atividade para ADK1. Cromatograma da solução 20 mM Tris (pH 7,4), 200 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ e 1 mM ADP, antes e após a incubação com ADK1.

Apêndice B Alguns dos demais trabalhos e atividades

- Realização de 99 créditos em disciplinas regularmente matriculado:
 - Introdução à Física Atômica Molecular
 - Práticas Pedagógicas & Comunicação e Expressão Oral
 - Estrutura e Função de Proteínas
 - Técnicas Físicas Aplicadas à Biologia Estrutural
 - Sistemas para Expressão de Proteínas Heterólogas
 - Princípios de Ressonância Magnética Nuclear
 - Práticas do Ensino de Física
 - Termodinâmica de Sistemas Biológicos
 - Biomoléculas: Estrutura e função
 - Introdução à Cristalografia Estrutural
 - Evolução de Proteínas
- Cursos internacionais fora do IFSC:
 - Macromolecular Crystallography: Int. & Appl. (Instituto Pasteur-Montevideo).
 - NMR in Structural Biology: from cloning to NMRPipe (LNLS-Campinas).
- Monitoria no IFSC: Estrutura da matéria.
- Programa de Aperfeiçoamento do Ensino: Laboratório de Física Moderna.
- Período de doutorado sanduíche na universidade de Regensburg (Alemanha)
- Participação na comissão organizadora do XIII Workshop da Pós-Graduação do IFSC
- Participação no projeto de assinalamento da proteína canacistatina
- Artigo finalizado para submissão:
 - Marques, I. A. *et al.* Septin C-Terminal Domain Interactions: Possible Implications for Filament Stability and Assembly