UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

DIEGO ANTONIO LEONARDO CABREJOS

**Especificidade na montagem de filamentos de Septinas: o caso da
interface G entre SEPT5 e SEPT8**

São Carlos
2016

DIEGO ANTONIO LEONARDO CABREJOS

Especificidade na montagem de filamentos de Septinas: o caso da interface G entre SEPT5 e SEPT8

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

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

Versão Original

São Carlos
2016

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 revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Leonardo Cabrejos, Diego Antonio
Especificidade na montagem de filamentos de
Septinas: o caso da interface G entre SEPT5 e SEPT8
/ Diego Antonio Leonardo Cabrejos; orientador
Richard Charles Garratt -- São Carlos, 2016.
146 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São
Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

1. GTPases. 2. Septinas. 3. Septina 5. 4. Septina
8. 5. Interação proteína-proteína. I. Garratt, Richard
Charles, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Diego Antonio Leonardo Cabrejos

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

Aprovado(a) em: 27/06/2016

Comissão Julgadora

Dr(a). Richard Charles Garratt

Instituição: (IFSC/USP)

Dr(a). Sandro Roberto Marana

Instituição: (IQ/USP)

Dr(a). Flávio Henrique da Silva

Instituição: (UFSCar/São Carlos)

Dedico este trabalho aos meus pais, Teresa e José, pelo apoio constante ao longo da minha vida pessoal e profissional.

Ao meu filho Noah Alessandro, que é um dos principais motivos de felicidade e perseverança na minha vida.

Ao meu grande amigo Pedro J. Chimoy, por sempre acreditar em mim e sua constante ajuda para realizar meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador e amigo o Prof. Dr. Richard Charles Garratt, pela oportunidade e confiança oferecida desde o ano 2012 para realizar meu primeiro estágio em iniciação científica e, com isso, permitindo-me apaixonar pela ciência e pela biologia estrutural. Obrigado pelos ensinamentos, pelas horas de estudo e de discussões, por ser um exemplo de professor e pesquisador.

Ao meu amigo o Prof. Dr. Pedro J. Chimoy, por mostrar uma amizade sincera, por ser um exemplo de pessoa, amigo, professor e pesquisador. Por sempre acreditar em mim e em minhas capacidades; por ser como um pai para mim.

Aos meus pais e irmãs: Teresa, José, Janet e Nubi, por ser um apoio incondicional além da distância, por sempre acreditarem em mim.

Aos professores do IFSC que contribuíram para a minha formação científica.

Aos técnicos do Laboratório de Biologia Estrutural: Humberto e Susana, pela ajuda incondicional durante estes dois anos de mestrado. Aos técnicos do Grupo de Biofísica Molecular, em especial a Andressa pela ajuda na realização dos experimentos biofísicos e pelas sugestões para trabalhar com septinas.

Aos meus amigos do “nosso U”: Paola Lanzoni, Fernanda Sala, Tatiana Watanabe e Mery Mendoza, por compartilhar inumeráveis horas de trabalho de laboratório, pelas sugestões, discussões e apoio constante, pela alegria que vocês transmitem a “nosso U”.

À Dra. Joci Macedo pelas orientações iniciais durante o projeto de pesquisa. À Sabrina Matos pela amizade e acolhida durante meu primeiro estágio no Brasil e pelos ensinamentos para me desenvolver no trabalho de laboratório. À Dra. Ana Eliza Zeraik pelas sugestões dadas durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa. Ao Dr. Napoleão Valadares pelo ensinamento do uso das ferramentas

bioinformáticas para estudos de modelagem. Ao Dr. Fernando Bachega pelo ensinamento de processamento e análises de dados cristalográficos.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia estrutural pela ótima convivência: Ivan Silva, Larissa Romanello, Michel De Groote, Natália Bellini, Juliana Torini, Ana Laura, Tomás Michellena, Victor Hugo Serrão, Adriano Fernandes, Jéssica Fernandes e Túlio Alves.

Ao meu caro amigo Erick Suclupe, pela grata companhia nestes dois anos. Porque os dias ficaram mais engraçados com sua companhia e me fez sentir como em casa.

A toda a galera que me recebeu em São Carlos; aos meus amigos do Peru que sempre me demonstraram seu apoio.

À FAPESP pela bolsa de mestrado concedida e permitir a realização deste projeto de pesquisa.

“Nosso cérebro para se manter em forma, precisa desafios, exigência, mudanças, mobilidade”

Sblomo Breznitz

“Nossas virtudes e nossos defeitos são inseparáveis, assim como a força e a matéria. Quando se separados, o homem deixa de existir”

Nikola Tesla

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas”

Carl Sagan

RESUMO

LEONARDO CABREJOS, D.A. **Especificidade na montagem de filamentos de Septinas: o caso da interface G entre SEPT5 e SEPT8.** 2016. 146 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Septinas abrangem uma família conservada de proteínas que ligam e hidrolisam GTP e formam heterofilamentos, anéis e redes para realizar as suas funções. Apresentam três domínios estruturais: o domínio N-terminal contendo uma sequência polibásica (para ligar membranas), o domínio de ligação ao nucleotídeo (G) e o domínio C-terminal que inclui uma sequência predita de formar um coiled-coil. Em humanos, as 13 septinas são classificadas em quatro grupos (I, II, III e IV) baseadas nas sequências de aminoácidos. O único filamento caracterizado estruturalmente, até hoje, é o formado por SEPT2-SEPT6-SEPT7, mostrando que as subunidades interagem através de duas interfaces (chamadas G e NC). Os determinantes estruturais da montagem correta do filamento são pouco conhecidos, sendo o estudo limitado pela complexidade em purificar e cristalizar complexos triméricos ou tetraméricos. Uma abordagem alternativa é estudar interfaces individuais de um filamento (G e/ou NC) por separado. Assim, o presente projeto objetivou estudar, utilizando uma abordagem biofísica e estrutural, a interface G formada por SEPT5 e SEPT8 para elucidar os fatores importantes em determinar a sua especificidade. Os domínios GTPase de SEPT5 e SEPT8 foram clonadas em vetor de expressão bicistrônico pET-Duet, co-expressas e co-purificadas. Estudos de análise do estado oligomérico e homogeneidade foram conduzidos utilizando cromatografia de exclusão molecular, espalhamento dinâmico de luz e ultracentrifugação analítica, revelando um complexo dimérico e monodisperso. O complexo apresenta uma mistura aproximadamente equimolar de nucleotídeos (GTP e GDP) ligados enquanto SEPT8(G) sozinha é incapaz de ligar qualquer um dos dois. Além disto o complexo apresenta uma termoestabilidade maior que SEPT8(G), verificado por um aumento em T_m de 5 °C. Com o intuito de observar os determinantes estruturais da especificidade, ensaios de cristalização foram conduzidos e assim, cristais do complexo SEPT5-SEPT8(G) que difrataram apenas

a muito baixa resolução foram obtidos. Na ausência de uma estrutura cristalográfica, modelagem por homologia foi realizada para analisar as interfaces G entre diferentes combinações de septinas. Identificamos uma interação entre aminoácidos característicos (aminoácidos únicos para cada grupo de septinas) para o complexo formado entre membros do grupo III, (incluindo SEPT5) e membros do grupo II, (incluindo SEPT8). Esta interação entre Phe131 (grupo III) e Thr19 (grupo II) pode explicar a especificidade na formação de uma interface G entre septinas destes grupos durante a formação do filamento e além disso, a importância da presença do GTP ligado ao septina do grupo II. Com isto, propomos pela primeira vez uma explicação plausível da relevância da perda de atividade catalítica das septinas deste grupo, um fato inexplicado até o momento. Mutação dos resíduos identificados levou a uma mudança no seu perfil de eluição do complexo durante purificação por exclusão molecular indicando alterações na formação do complexo mutante.

Palavras chaves: GTPases. Septinas. Septina 5. Septina 8. Interação proteína-proteína.

ABSTRACT

LEONARDO CABREJOS, D.A. **Specificity in the assembly of Septins filaments: the case of the G interface between SEPT5 and SEPT8.** 2016. 146 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Septins are a conserved family of proteins that bind and hydrolyze GTP and form heterofilaments, rings and networks in order to carry out their functions. They have three structural domains: an N-terminal domain containing a polybasic sequence (for membrane binding), a nucleotide-binding (G) domain and a C-terminal domain including a sequence predicted to form a coiled-coil. In humans, 13 septins have been classified into four groups (I, II, III and IV) based on their amino acid sequences. The only structurally characterized filament described to date is formed by SEPT2-SEPT6-SEPT7, which reveals that the subunits interact through two different interfaces (G and NC). The structural determinants of correct filament assembly are poorly known, and this is limited by the complexity of purifying and crystallizing trimeric or tetrameric complexes. An alternative approach is to study a single filament interface (G or NC) on its own. Here, we aimed to study, using biophysical and structural approaches, the G interface formed between SEPT5 and SEPT8 to elucidate the factors relevant to determining its specificity. The GTPase domain of SEPT5 and SEPT8, were cloned into the bicistronic expression vector pET-Duet, co-expressed and co-purified. Studies to determine the oligomeric state and homogeneity of the complex were conducted using size exclusion chromatography, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation, revealing a monodisperse dimer for SEPT5-SEPT8(G). The complex elutes with an approximately equimolar mixture of bound nucleotides (GTP and GDP) whereas SEPT8(G) alone is shown to be unable to bind either. Furthermore, the complex has a greater thermostability than SEPT8(G), demonstrated by an increase of 5°C in T_m . In order to determine the structural determinants of specificity, crystallization trials were conducted and crystals of the SEPT5-SEPT8(G) complex were obtained, but these diffracted to only very low resolution. In the absence of a crystal structure, homology modeling was performed to analyze the potential G interfaces between

different septin combinations. An interaction between characteristic amino acids (those which are unique to given septin group) was identified for the complex formed between group III septins (including SEPT5) and group II septins (including SEPT8). This interaction, between Phe131 (group II) and Thr19 (group III) may explain the specificity in the formation of a G interface between septins of these groups during filament formation and furthermore the importance of GTP bound to the group II septin. These observations allow us to propose for the first time a plausible explanation for relevance of the loss of catalytic activity by this septin group, an unexplained fact up until now. Mutation of the identified residues resulted in a change in the elution profile of the complex from the size exclusion column suggesting structural alterations in the mutants.

Keyword: GTPase. Septins. Septin 5. Septin 8. Protein-protein interaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Identificação de septinas em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
Figura 2 - Árvore filogenética mostrando a distribuição de septinas em organismos eucariontes.	26
Figura 3 - A diversidade de funções das septinas nos processos celulares.	27
Figura 4 - Filamentos de septinas em diversos organismos.....	28
Figura 5 - Domínios estruturais de uma septina.....	29
Figura 6 - Domínio G altamente conservado em septinas.....	31
Figura 7 - Motivos conservados em septinas (G1, G3 e G4) coordenando interações com o análogo de GTP, GppNHp.	32
Figura 8 - Proposta para formação de coiled-coil em septinas.....	35
Figura 9 - Classificação das septinas humanas.	36
Figura 10 - Heterocomplexo de septinas formado por SEPT2 (vermelho), SEPT6 (azul) e SEPT7 (amarelo).	38
Figura 11 - Filamentos dos domínios GTPase septinas observados no cristal.....	39
Figura 12 - Regras de Kinoshita para a substituição de septinas no filamento.....	40
Figura 13 - Domínios estruturais, baseados na sequência, da SEPT5 e SEPT8.....	45
Figura 14 - Passos do experimento da Termoforese em Microescala.	65
Figura 15 - Decomposição do feixe de luz plano polarizado.	67
Figura 16 - Espectro de CD no UV-distante.	68
Figura 17 - Gráfico da intensidade de fluorescência frente à temperatura para a desnaturação térmica de uma proteína em presença de SYPRO Orange.	72

Figura 18 - Passos para a predição da estrutura de uma proteína utilizando modelagem por homologia.	77
Figura 19 - Análise de amplificação dos genes SEPT5 e SEPT8 (e suas versões truncadas).....	84
Figura 20 - Expressão e Purificação do complexo SEPT5-SEPT8(NGC).....	87
Figura 21 - Expressão e Purificação do complexo SEPT5-SEPT8(G).....	89
Figura 22 - Espectrometria de massa dos complexos SEPT5-SEPT8(NGC) e SEPT5-SEPT8(G).	90
Figura 23 - Expressão e purificação de septinas individuais.	91
Figura 24 - Curva de calibração da coluna cromatográfica HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade.	92
Figura 25 - Aproximação das dimensões de um complexo tetramérico formado por SEPT5 e SEPT8.	93
Figura 26 - Gráfico do DLS mostrando as espécies em solução detectadas pela intensidade de luz espalhada.....	95
Figura 27 - Gráfico do DLS mostrando as espécies em solução detectadas pela intensidade de luz espalhada.....	98
Figura 28 - Resultados de DLS obtidos para o complexo SEPT5-SEPT8(G) a 3mg/mL. ...	101
Figura 29 - Cromatograma do HPLC mostrando a presença de nucleotídeos.....	102
Figura 30 - Cromatograma mostrando que SEPT8(G) no muda seu estado oligomérico quando é incubada com nucleotídeos.....	104
Figura 31 - Termoforese de SEPT8(G) frente ao GTP.	105
Figura 32 - Termoforese de SEPT8(G) frente ao GDP.....	107
Figura 33 - Espectros de dicroísmo circular.	111
Figura 34 - Estabilidade térmica das proteínas no tampão de purificação.....	113

Figura 35 - Cristais obtidos pelo screening com o kit Morpheus na condição G7.....	115
Figura 36 - Cristais obtidos no refinamento das condições do kit JCSG Suite. A) Condição A1 do refinamento. B) Condição A2 do refinamento.	116
Figura 37 - Alinhamento estrutural entre as 13 septinas humanas e SmSEPT10 (usado para a modelagem).....	118
Figura 38 - Interação entre os aminoácidos específicos dos complexos SEPT2-SEPT6(G) e SEPT7-SEPT9(G).	121
Figura 39 - Porcentagem de ocorrência da interação Phe131 e Thr19 vista nos dez melhores modelos para cada uma das combinações possíveis entre as septinas dos grupos II e III.....	123
Figura 40 - Expressão e purificação do complexo mutante SEPT5F/T-SEPT8(NGC).....	125
Figura 41 - Expressão e purificação do complexo mutante SEPT5-SEPT8T/S(NGC).....	126
Figura 42 - Expressão e purificação do complexo mutante SEPT5F/T-SEPT8T/S(NGC).	127
Figura 43 - Proposta para polimerização de um complexo canonico de septinas.	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Oligonucleotídeos utilizados para a clonagem de SEPT5 e SEPT8.....	46
Tabela 2 -	Detalhes da reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do gene SEPT8.....	47
Tabela 3 -	Detalhe da reação de ligação de SEPT8 em pGEM-T Easy.....	48
Tabela 4 -	Detalhes da reação de digestão	49
Tabela 5 -	Gradiente de NaCl utilizado na cromatografia de troca iônica	62
Tabela 6 -	Condições de cristalização kit MORPHEUS	75
Tabela 7 -	Condições de cristalização kit JCSG + Suite	76
Tabela 8 -	Combinações canônicas (✓) e não canônicas (X) de septinas.	79
Tabela 9 -	Oligonucleotídeos para mutagêneses sitio dirigida.....	80
Tabela 10 -	Tampões para purificação	85
Tabela 11 -	Distribuição de resultados do DLS para o complexo SEPT5-SEPT8(NGC).....	95
Tabela 12 -	Resultados da ultracentrifugação analítica para o complexo SEPT5-SEPT8(NGC)	96
Tabela 13 -	Distribuição de resultados do DLS para o complexo SEPT5-SEPT8(G).....	97
Tabela 14 -	Resultados da ultracentrifugação analítica para o complexo SEPT5-SEPT8(G).....	99
Tabela 15 -	Medidas de DLS a diferentes concentrações do complexo SEPT5-SEPT8(G).....	99
Tabela 16 -	Fluorescência detectada no tempo t=30 para cada uma das concentrações no gradiente de nucleotídeo	106
Tabela 17 -	Lista de valores obtidos para avaliação da qualidade dos modelos.....	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AUC	Ultracentrifugação analítica, do inglês Analytical ultracentrifugation
CD	Dicroísmo circular, do inglês Circular Dichroism
<i>D</i>	Coeficiente de difusão translacional
DLS	Espalhamento dinâmico de luz, do inglês Dynamic Light Scattering
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DO	Densidade óptica
DOPE	Discrete Optimized Protein Energy
DSF	Fluorimetria Diferencial de Varredura, do inglês Differential Scanning Fluorimetry
<i>D_T</i>	Coeficiente de difusão termal
<i>f</i>	Coeficiente friccional
GDP	Guanosina difosfato
GppNHp	5'-guanilil imidodifosfato
GST	Glutathione-S-transferase
GTP	Guanosina trifosfato
IMAC	Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
ITC	Calorimetria de Titulação Isotérmica, do inglês Isothermal Titration Calorimetry
<i>K</i>	Constante de Boltzman
LB	Luria-Bertani
LEC	Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria
LNBio	Laboratório Nacional de Biociências
LogMW	Logaritmo da massa molecular
MCS	Sítio múltiplo de clonagem, do inglês Multiple Cloning Site
MLL	Leucemia de linhagem misto, do inglês Mixed-lineage Leukemia.
MST	Termoforese em Microescala, do inglês Microscale Thermophoresis
<i>N_{av}</i>	Número de Avogadro
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês Polymerase Chain Reaction

R_H	Raio hidrodinâmico
s	Coeficiente de sedimentação
S	Svedberg
SDS-PAGE	Eletroforese usando gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes
SE	Sedimentação e Equilíbrio, do inglês Sedimentation and Equilibrium
SEC	Cromatografia de exclusão molecular
SEPT	Septina
SPR	Ressonância Plasmônica de Superfície, do inglês Surface Plasmon Resonance
SUE	Elementos únicos de septinas, do inglês, Septin Unique Element
SV	Velocidade de sedimentação, do inglês Sedimentation velocity
T_m	Temperatura de melting
UV	Comprimento de onda de luz visível
V_{bar}	Volume parcial específico
VTFM	Variable Target Function Method
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo
η	Viscosidade
ρ_f	Densidade do solvente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	Septinas: descoberta e funções	25
1.2	Estrutura de uma septina	29
1.2.1	Domínio N-terminal	29
1.2.2	Domínio de ligação ao nucleotídeo ou domínio G	30
1.2.3	Domínio C-terminal	33
1.3	Septinas humanas	36
1.3.1	SEPT5 e SEPT8	42
2	OBJETIVOS	43
2.1	Objetivo geral	43
2.2	Objetivos específicos	43
3	MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1	Definição dos domínios N-terminal, GTPase e C-terminal de SEPT5 e SEPT8	45
3.2	Clonagem de SEPT5 e SEPT8 em vetores de expressão bicistrônicos	46
3.3	Expressão dos complexos recombinantes em <i>E. coli</i> Rosetta DE3	50
3.4	Purificação dos complexos SEPT5-SEPT8	51
3.5	Obtenção de SEPT8G monomérica	52
3.6	Estimativa da massa molecular dos complexos SEPT5-SEPT8	52
3.7	Confirmação da identidade dos complexos SEPT5-SEPT8 por espectrometria de massas	53
3.8	Caracterização biofísica	54
3.8.1	Análise da homogeneidade e de agregação dos complexos SEPT5-SEPT8(NGC) e SEPT5-SEPT8(G)	54
3.8.1.1	Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	55
3.8.1.2	Ultracentrifugação analítica (AUC)	57
3.8.2	Análise do conteúdo de nucleotídeos	61
3.8.3	Avaliação da ligação dos nucleotídeos GTP e GDP para SEPT8(G) usando Termoforese em Microescala (MST)	62
3.8.4	Análise do enovelamento do complexo SEPT5-SEPT8(G) e SEPT8(G) com espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD)	66
3.8.5	Estabilidade térmica do complexo SEPT5-SEPT8(G) e SEPT8(G)	69
3.8.5.1	Fluorimetria diferencial de varredura (DSF)	70
3.8.5.2	Espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD)	73

3.8.6	Ensaio de cristalização e coleta de dados do complexo SEPT5-SEPT8(G)	74
3.9	Modelagem por homologia.....	76
3.10	Análise de mutantes do complexo SEPT5-SEPT8 NGC	80
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
4.2	Expressão, purificação e identificação dos complexos SEPT5-SEPT8	84
4.3	Caracterização biofísica	94
4.3.1	Estado de homogeneidade e de agregação dos complexos SEPT5-SEPT8(NGC) e SEPT5-SEPT8(G).....	94
4.3.2	Conteúdo de nucleotídeos do complexo SEPT5-SEPT8(G) e SEPT8(G)..	101
4.3.3	Ligação de GTP e GDP em SEPT8(G)	104
4.3.4	Enovelamento e estabilidade térmica do complexo SEPT5-SEPT8(G) e SEPT8(G)	109
4.4	Cristalização do complexo SEPT5-SEPT8(G)	114
4.5	Modelagem por homologia.....	116
4.6	Expressão e purificação dos complexos mutantes.....	124
5	CONCLUSÕES.....	129
6	PERSPECTIVAS	133
	REFERÊNCIAS	135

1 INTRODUÇÃO

1.1 Septinas: descoberta e funções

As septinas foram inicialmente reportadas em 1971 por L. H. Hartwell em mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* sensíveis a temperatura e com defeito na citocinese. Ele observou que mutação no gene *cdc1* confere dificuldade na formação do broto na célula em divisão quando ela está em temperatura restritiva (existe replicação do DNA, mas não divisão do núcleo). Por outro lado, mutações em quatro genes (*cdc3*, *cdc10*, *cdc11* e *cdc12*) resulta em defeitos na citocinese, especificamente. Em temperaturas restritivas, a célula com estes quatro genes mutantes desenvolve múltiplos brotos alongados que não se separam da célula mãe (mas é observado a replicação do DNA e a divisão nuclear, ou seja, formação de células multinucleadas). (1) Poucos anos depois, utilizando microscopia eletrônica, foram identificados filamentos dentro do broto da levedura em divisão, estes filamentos de aproximadamente 10 nm de espessura rodeavam o ponto de união entre a célula mãe e o broto, conhecido como *bud neck* (Figura 1A). (2) Com a ajuda de microscopia de fluorescência, foi possível investigar os componentes do anel que rodeavam o *bud neck* e foram identificados as proteínas expressas pelos genes *cdc3*, *cdc10*, *cdc11* e *cdc12* (Figura 1B). Devido ao fato que estas proteínas formavam o septo da célula em divisão, John Pringle nomeou elas como “septinas”. (3)

Figura 1 - Identificação de septinas em *Saccharomyces cerevisiae*. A) As setas sinalizam os filamentos de septinas identificados no *bud neck*. B) Localização das septinas durante a divisão celular. Em (a) e (b) septinas localizadas no extremo da célula, em (c) e (d) elas começam se localizar entre o broto em nascimento e finalmente em (e) e (f) o anel de septinas localizados no septo da célula em divisão e no extremo após divisão celular, respectivamente.

Fonte: Adaptada de BYERS; GLADFELTER et al. (2,124)

Septinas de outros organismos modelo como *Caenorhabditis elegans* (*unc-59* e *unc-61*), *Drosophila melanogaster* (*pnut*, *sept1*, *sept2*, *sept4* e *sept5*), *Schistosoma mansoni* (*sept5*, *sept7.1*, *sept7.2* e *sept10*) e *Mus musculus* (*sept1* – *sept12*) são tão bem estudadas quanto as anteriormente mencionadas. (16–22)

Assim como septinas estão presentes em uma grande diversidade de organismos, elas desempenham diversas funções estruturais na célula (formando estruturas de alto ordem como: filamentos, anéis, redes e barreiras de difusão em membranas) e ademais servem como um andaime para recrutamento de outras proteínas. Assim, septinas estão presentes durante a divisão celular (posicionamento e alongação do fuso mitótico (23), segregação dos cromossomos (24), citocinese (25–27) e controle do ciclo celular (28), na polarização celular durante a embriogênese (16,29), barreiras de difusão (30–32), organização de membranas e do citoesqueleto (33–34), regulação do crescimento e morfologia das espinhas dendríticas em neurônios de mamíferos (22,35–36), espermatogênese (37–38), exocitose (39), ciliogênese (40–41), na resposta a infecções (42), fagocitose (43) além de outros processos biológicos. (Figura 3)

Figura 3 – A diversidade de funções das septinas nos processos celulares.

Fonte: Adaptada de MOSTOWY; COSSART. (34)

formação dos heterofilamentos foi observada inicialmente em levedura e depois em nemátodos, mosca, camundongo, platelminto e humanos (17,33,44–46). Os

filamentos em levedura apresentam como unidade básica de polimerização octâmeros, os quais estão formados por duas cópias das quatro septinas, em uma ordem específica como mostrado na figura 8A. O filamento encontrado no nemátodo *C. elegans* é formado por tetrâmeros como unidade básica de polimerização e na seguinte ordem UNC-59 – UNC-61 – UNC-61 – UNC-59. Em mosca *D. melanogaster* o filamento é formado pelo complexo Pnut, Sep1 e Sep2 com uma proporção 1:1:1, na ordem específica Pnut-Sep2-Sep1-Sep1-Sep2-Pnut. No caso do platelminto *Schistosoma mansoni* foi identificado um filamento formado pelas septinas SmSEPT5-SmSEPT10-SmSEPT7.2, mas a sua disposição ainda não foi confirmada. O filamento formado por septinas humanas tem como unidade básica de polimerização hexâmeros ou octâmeros, os quais são formados a partir de trímeros ou tetrâmero em uma ordem específica como será explicado em breve. (Figura 4)

Figura 4 - Filamentos de septinas em diversos organismos. A) Septinas de *C. elegans*; B) Septinas de *D. melanogaster*; C) Septinas de *S. cerevisiae*; D) *Sept2* de *Xenopus laevis* formando filamentos influencia pela presença de GTP; E) Septinas humanas SEPT2-SEPT6-SEPT7.

Fonte: Adaptada de JOHN et al; FIELD et al; FIELD; KELLOGG; MENDOZA et al; SIRAJUDDIN et al. (17,33,45,72,76)

1.2 Estrutura de uma septina

Septinas são proteínas pertencentes à família das *P-loop* GTPases e a maioria delas apresentam três domínios: um domínio G muito bem conservado (normalmente com atividade GTPasica) de ligação ao GTP/GDP, um domínio amino-terminal variável que geralmente possui uma região polibásica e um domínio carboxi-terminal também variável contendo sequências compatíveis com a formação de *coiled-coils* (Figura 5). (5)

Figura 5 – Domínios estruturais de uma septina. O domínio N-terminal possui uma região polibásica que permite a ligação na membrana celular, o domínio GTPase (G) que possui os motivos conservados das GTPases G1, G3 e G4 e também uma região única e característica para septinas (SUE) e por último o comino C-terminal que pode formar *coiled-coil*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

1.2.1 Domínio N-terminal

O domínio amino-terminal de septinas possui uma região polibásica que apresenta interação com membranas celulares. (47-48) Esta região está presente no extremo do domínio N-terminal mais próximo ao domínio GTPase (Figura 5). Foi observado que a SEPT4 de mamíferos é capaz de ligar fosfolipídios de membrana celular utilizando a região polibásica, uma vez que mutada esta região não há mais interação proteína-membrana. Foram identificados a ligação específica para os fosfolipídios: fosfatidil-inositol 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P₂) e fosfatidil-inositol (3, 4, 5)-trifosfato (PtdIns(3, 4, 5)P₃). (47) Pouco depois, foi notado que septinas de levedura apresentaram uma especificidade diferentes ligando fosfatidil-inositol (4)-fosfato e fosfatidil-inositol (5)-fosfato. Utilizando mutantes de Cdc11, novamente foi demonstrado que é a região polibásica que permite a ligação específica para estes fosfolipídios. (48) O resto do domínio N-terminal é geralmente previsto a ser inteiramente desestruturada. (49)

1.2.2 Domínio de ligação ao nucleotídeo ou domínio G

O domínio central ou domínio de ligação ao nucleotídeo ou simplesmente domínio G, é o mais conservado em septinas apresentando como mínimo 75% de similaridade entre septinas da mesma espécie (5), sendo esta conservação tanto na sequência quanto na estrutura tridimensional de septinas (Figura 6). Septinas possuem claramente três dos cinco motivos conservados em *P-loop* GTPases (G1-G5): o motivo G1 ou *P-loop*, que interage com os grupos fosfato do nucleotídeo, o motivo G3 que liga o cofator Mg^{+2} e pode interagir também com o β e γ fosfato do GTP e finalmente o motivo G4 que confere especificidade ao nucleotídeo GTP. (33) Septinas não apresentam os motivos G2 e G5 e por esta razão elas estão mais similares com as GTPases da superfamília Ras. Estas proteínas possuem um mecanismo que permite a hidrólise do nucleotídeo GTP e a troca do GDP (após a hidrólise) por uma nova molécula de GTP, sendo este mecanismo coordenado por dois motivos: *Switch I* e *Switch II* (motivos também presentes em septinas). (50)

Figura 6 - Domínio G altamente conservado em septinas. A) Alinhamento de sequência de aminoácidos dos domínios GTPase das septinas Cdc11 de *S. cerevisiae*, SEPT10 de *S. mansoni* e SEPT3 de *H. sapiens*. Os aminoácidos conservados para as três espécies estão pintados de azul, mostrando a alta conservação na estrutura primária. Em B, C e D as estruturas cristalográficas de Cdc11, SmSEPT10 e SEPT3, respectivamente. É possível observar a conservação na estrutura tridimensional de septinas das três espécies, sendo uma estrutura do tipo α com um núcleo governado por folhas- β . Códigos PDB das estruturas: Cdc11 (5AR1), SmSEPT10 (4KV9) e SEPT3 (4Z54).

Fonte: Elaborada pelo autor.

O motivo G1 ou *P-loop* em septinas é o mais conservado dentre todos apresentando a sequência GxxxxGK[ST]L. Neste motivo se destaca os aminoácidos Gly no início do motivo e na posição 6, presentes em cerca de 99-100% de septinas. No entanto, a posição 7 pode ser ocupada com 98% de ocorrência por Lys ou Arg, seguido por Ser ou Thr que são aminoácidos conservados em 100% de septinas. (5) A partir da estrutura cristalográfica de SETP2-GppNHp (código PDB: 3FTQ) podemos observar que: a Gly na posição 6 interage pelo grupo amino da sua cadeia principal com o α fosfato do nucleotídeo, já a Lys (K50) interage diretamente com o β e γ fosfato, a Ser (S51) forma uma ligação com o Mg^{+2} e a Thr (T52) forma uma ligação de hidrogênio através do seu grupo hidroxila com o α fosfato (Figura 7). (51) A Thr52 é específica para septinas, uma vez que em outras pequenas GTPases está ausente.

O motivo G4 caracterizado pelo consenso xKxD, que em septinas corresponde à sequência AKAD, confere a especificidade ao GTP frente a qualquer outro nucleotídeo. A Lys (K183) faz uma interação direta com a ribose enquanto que o Asp (D185) coordena com a base guanina, assim conferindo a especificidade ao GTP (Figura 7). (51-52)

Pan e colaboradores (5), em um trabalho onde analisaram 162 sequências de septinas de diferentes organismos, acharam novos e característicos motivos de septinas. Eles foram nomeados como: S1 com o consenso ExxxxR (entre o G3 e o G4), onde tanto a Glu quanto a Arg são aminoácidos importantes para a estabilização da interface NC (definida nos seguintes tópicos) (53); S2 com o consenso DxR[VI]Hxxx[YF]F[IL]xP (entre o G3 e o G4), este motivo pode estar relacionado com a estabilidade do domínio G; S3 com o consenso GxxLxxxD (entre o G3 e o G4) e finalmente o motivo S4 com o consenso WG, que pode estar relacionado com a estabilidade de orientação da hélice alfa 5' (mencionado nos seguintes tópicos). (5)

O domínio G apresenta na sua extremidade mais próxima ao domínio C-terminal uma região de 53 aminoácidos altamente conservados que são únicos para septinas e por este motivo foi nomeada como “elementos únicos de septinas” ou SUE (do inglês *Septin Unique Element*). (54) Em sua análise, eles observaram que esta região apresenta 92% de similaridade entre septinas. (5) Após revelada a estrutura cristalográfica do complexo de septinas SEPT2-SEPT6-SEPT7 e de septinas individuais (SEPT2, SEPT7, SEPT3, SEPT7, *Sm*SEPT10), foi possível observar que o SUE é uma região determinante para estabilizar as interfaces G e NC durante a polimerização em forma de filamentos. (51,53,55-56)

1.2.3 Domínio C-terminal

O domínio C-terminal em septinas apresenta comumente uma sequência que é predita para formar estruturas em hélices α do tipo *coiled-coil*. Para formar estas estruturas são necessários duas ou mais hélices α anfipáticas que se complementam. Esta estrutura tem sido apontada em estudos como responsável por desempenhar um papel na determinação preferencial durante a associação de

septinas na formação do filamento fisiológico. Estes *coiled-coils* foram identificados no C-terminal de septinas em *S. cerevisiae* onde: Cdc3 e Cdc12 foram apontados como requeridos para associação entre elas e realização de suas funções, já para Cdc11 este domínio não foi apontado como indispensável para realização de funções e em Cdc10 não foi identificado por ter um C-terminal curto. (54) Anos mais tarde foi possível determinar a importância dos *coiled-coils* tanto na montagem do filamento quanto na polimerização de dois filamentos adjacentes, propondo que *coiled-coil* paralelos são formados por CDC12 e CDC3 num filamento e posteriormente dois filamentos podem-se associar via ligações cruzadas feitas pelos *coiled-coil* interagindo de forma antiparalela (Figura 8A). (9)

Em um estudo de *coiled-coil* de septinas humanas foi observado que os C-terminais de SEPT6, SEPT7 e SEPT2 quando são expressos e purificados individualmente, se comportam como homodímeros, no entanto quando o C-terminal de SEPT6 e SEPT7 são ligados por cross-linking podem ser purificados como heterodímeros. Porém, análises de afinidade conclui que a interação entre C-terminal de SEPT7-SEPT6 é preferida na presença, além destas septinas, de SEPT2. (57) Foi obtida uma estrutura cristalográfica do *coiled-coil* de SEPT4, observando-se que ela forma um *coiled-coil* homodimérico e antiparalelo, com isto propondo que a formação de filamentos cruzados entre septinas humanas seria diferente à observada em *S. cerevisiae*, uma vez que é esperado que os *coiled-coil* heterodiméricos formados por SEPT6 e SEPT7 seriam paralelos (Figura 8B). (58)

Figura 8 - Proposta para formação de *coiled-coil* em septinas A) Septinas de *Saccharomyces cerevisiae* formando interações proteína-proteína via *coiled-coil* paralelo entre Cdc3 e Cdc12, permitindo posteriormente interações cruzadas entre dois filamentos adjacentes. B) Formação de *coiled-coil* entre septinas humanas. Os *coiled-coil* entre SEPT6-SEPT7 estabiliza o filamento, no entanto os *coiled-coil* entre homodímeros de SEPT2 permitem as interações cruzadas entre filamentos adjacentes.

Fonte: Adaptada de BERTIN et al; DE ALMEIDA MARQUES. (9,58)

1.3 Septinas humanas

Inicialmente foram identificados 13 genes que codificavam septinas em humanos (*SEPT1* – *SEPT13*) e que apresentavam múltiplas isoformas por uma alta taxa de *splicing* alternativo. Pouco depois foi identificado um gene com uma nova septina, Septina 14 e que *SEPT13* estava relacionada com *SEPT7*, sendo um pseudogene, portanto trocado o nome para *SEPT7P2*. (59-60) As treze septinas humanas (*SEPT1-SEPT2* e *SEPT14*) foram então classificadas em 4 grupos baseados na sequência de aminoácidos e nos domínios estruturais de septinas (Figura 9). (4)

Figura 9 - Classificação das septinas humanas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Podemos observar que os grupos apresentam atributos específicos: O grupo I é caracterizado por possuir um domínio C-terminal curto, portanto, ausência de sequências preditas para formar *coiled-coil*. Dentro deste grupo está a *SEPT9* que apresenta o domínio N-terminal maior de entre todas as septinas. O grupo II apresenta maior domínio C-terminal dentre as 13 septinas e é caracterizado por não apresentar a Thr catalítica do *Switch 1* portanto é o único grupo sem atividade catalítica. O grupo III, com o domínio C-terminal de tamanho médio apresenta uma sequência predita para *coiled-coil* e dentro deste grupo está *SEPT4* com o segundo

domínio N-terminal maior de entre as septinas humanas. Finalmente o grupo IV que é caracterizado por possuir só a SEPT7, a qual apresenta um C-terminal de tamanho similar ao grupo II e por esta razão é postulado que eles formam *coiled-coil* heterodiméricos (comprovado com estudos de afinidade). (57)

Em termos funcionais, as septinas humanas desempenham inúmeras funções que já foram descritas no item 1.1, e para isto polimerizam na forma de filamentos. Os mesmos são normalmente heterofilamentos os quais são montados utilizando preferentemente septinas de diferentes grupos numa ordem específica. (55) As septinas também podem estar envolvidas em diversas doenças em humanos tais como: Leucemia (participando como proteínas de fusão com MLL; *SEPT5*, *SEPT6*, *SEPT9* e *SEPT11*) (61–63); câncer de mama (64-65), ovário (64,66), cérebro (67) e outros; doenças neurodegenerativas como Alzheimer (68) e Parkinson (69); síndrome de Down (70-71); entre outras. Portanto, compreender os mecanismos moleculares exatos que controlam a correta montagem destes filamentos individuais e posteriormente em estruturas de ordem superior (feixes, redes, anéis, etc) representa um dos maiores desafios nos estudos das septinas atualmente. De tal modo, pela importância das septinas nas funções celulares, diversos estudos foram realizados para compreender: a função do GTP (e sua hidrólise) na montagem do filamento (51,72-73); estudos funcionais para conhecer qual é o papel de cada domínio das septinas (49,57,74); e por último estudos biofísicos e estruturais tanto de septinas individuais (*SEPT2*, *SEPT7* e *SEPT3*) quanto do complexo *SEPT2-SEPT6-SEPT7* para entender a relação estrutura/função. (51,53,55-56)

O filamento de septinas humanas melhor caracterizado é o composto por *SEPT2*, *SEPT6* e *SEPT7*. Foi inicialmente observada a polimerização espontânea do complexo em filamentos quando *SEPT2*, *SEPT6* e *SEPT7* são co-expressas em bactéria e co-purificadas com uma proporção 1:1:1. (75) Alguns anos depois, mais detalhes do filamento formado por *SEPT2-SEPT6-SEPT7* foram revelados, observando que a unidade básica de polimerização do filamento são hexâmeros, os quais, são formados pela união de dois trímeros em uma ordem específica (Figura 10). (76)

Figura 10 – Heterocomplexo de septinas formado por SEPT2 (vermelho), SEPT6 (azul) e SEPT7 (amarelo). No complexo hexamérico é possível observar as interfaces de contato (interface G e interface NC), a ligação de GTP em SEPT6 e GDP em SEPT2 e SEPT7. As setas projetam o C-terminal de cada subunidade, o que é predito para formação dos *coiled-coil*. O código PDB do complexo: 2QAG.

Fonte: Elaborada pelo autor

Esta estrutura cristalográfica com 4 Å de resolução, o único heterocomplexo de septinas cristalizado e resolvido até esta data, revela que o hexâmero é formado na seguinte sequência: SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7, e que é formado por dois tipos de interfaces envolvendo o domínio G: a interface G formada pela região de ligação ao nucleotídeo e a interface NC envolvendo as regiões N e C-terminal do domínio G (G e NC respectivamente na figura 10). Observando a estrutura é possível identificar uma interface NC homotípica entre SEPT2-SEPT2 e uma interface NC heterotípica entre SEPT6-SEPT7. Além disto há uma interface G heterotípica entre SEPT2-SEPT6 e uma interface G homotípica SEPT7-SEPT7 (que permite a polimerização de hexâmeros para formar um filamento). Também foi observado que septinas no complexo apresentam nucleotídeos ligados, sendo GDP, ligado a SEPT2 e SEPT7, e GTP para SEPT6 (que é membro do grupo cataliticamente inativo).

Como mencionado, os filamentos fisiologicamente relevantes são heteropolímeros, ou seja, homofilamentos de septinas são extremamente raros. Porém, foi observado este comportamento para Sept2 de *Xenopus laevis* (na presença de GTP), para SEPT2 humana tanto na presença de GTP e GDP (ambos *in vitro*) e finalmente para SEPT4 humana. Neste último caso os homofilamentos foram caracterizados como amilóides em condições *in vitro*. (72,77-78) Portanto, é surpreendente observar filamentos nas estruturas cristalográficas dos domínios G de

diversas septinas quando são cristalizadas sozinhas. Este comportamento é observado para SEPT2, SEPT7, SEPT3 e SEPT10 de *Schistosoma mansoni* (Figura 11). (51,53,56,79)

Figura 11 - Filamentos dos domínios GTPase septinas observados no cristal. Quando septinas individuais são cristalizadas, é possível observar a formação de filamentos montado pelas mesmas interfaces G e NC vistas no complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7. Código PDB do complexo: 2QAG.

Fonte: Elaborada pelo autor.

É importante ressaltar que os filamentos observados no cristal de septinas individuais apresentam as mesmas interfaces G e NC visualizadas no complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7, embora não se espera encontrar algumas destas interações em um heterofilamento fisiologicamente funcional, como por exemplo a interface NC homotípica para SEPT7 ou a interface G e NC homotípica para *Sm*SEPT10. Por este motivo, algumas destas interfaces são classificadas como interações promíscuas, distinguindo-as das interfaces fisiológicas envolvidas em heterofilamentos. (80)

Uma contribuição relevante para o entendimento da montagem do filamento foi dada por Kinoshita, onde expressando septinas humanas no sistema de baculovirus observou que: septinas do mesmo grupo podem ser substituídas no heterofilamento.(81) Assim, SEPT2 pode ser substituída por SEPT4, SEPT5 ou SEPT1; SEPT6 por SEPT8, SEPT11, SEPT10 ou SEPT14; SEPT3 por SEPT9 e SEPT12 e por último SEPT7 não pode ser substituída por ser a única no seu grupo (Figura12 e Figura 9).

Figura 12 - Regras de Kinoshita para a substituição de septinas no filamento. Estas regras definem que septinas, dentro de um filamento, podem ser substituídas por outras do mesmo grupo. Assim, temos que SEPT2 pode ser substituída por SEPT5, SEPT6 por SEPT8 e SEPT9 por SEPT3. SEPT7 não pode ser substituída por ser a única representante do seu grupo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir destes resultados obtidos por Kinoshita, foi introduzido o termo “Regras de Kinoshita” para a montagem dos filamentos (o que limita o número de combinações possíveis). Com fundamento nas “Regras de Kinoshita”, os grupos de pesquisa de Biofísica Molecular e Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos, em colaboração com o Laboratório Nacional de Biociências – LNBio, realizaram o projeto “Interactoma das septinas humanas”. (82) Com este trabalho (usando duplo híbrido) reforçaram os resultados obtidos por Kinoshita, mostrando que é possível a substituição de septinas dentro de um mesmo grupo. Além disso foi proposta a formação de um filamento baseado em octâmeros como a unidade básica. Nesta proposta, octâmeros de septinas seriam formados por septinas do grupo I ficando no extremo do filamento octamérico (Figura 12). (82) Este modelo, que justifica a existência dos quatro grupos, foi comprovado por Kim e colaboradores. (83) Reforçando as Regras de Kinoshita, análises de duplo e triplo híbrido observaram que SEPT2 pode ser substituída, no trímero SEPT2-SEPT6-SEPT7, por SEPT4 ou SEPT5 e SEPT6 por SEPT8 ou SEPT11. (84)

Uma vez que a estrutura cristalográfica do complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7 apresenta 4 Å de resolução, não foi possível extrair informações suficientes para inferir quais são os determinantes estruturais para a especificidade de disposição das subunidades no filamento. Também, o fato de observar nas estruturas de septinas individuais as mesmas interfaces de polimerização (G e NC), levanta a questão do que controla a montagem do filamento e qual é a base da especificidade.

Assim, projetos co-expressando e co-purificando complexos triméricos e tetraméricos estão sendo desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa onde são estudados complexos tanto canônicos (obedecendo as regras de Kinoshita) quanto não canônicos (não obedecendo as regras de Kinoshita). Porém, trabalhar com estes complexos não é trivial e, portanto, resultados positivos são obtidos com muita dificuldade. Em vista deste problema, diminuir o grau de complexidade e estudar as interfaces que permitem a polimerização de modo individual, é uma alternativa prometedora no estudo estrutural de septinas.

1.3.1 SEPT5 e SEPT8

SEPT5, antigamente conhecida como CDCrel-1, foi inicialmente detectada como expressa preferentemente em cérebro e estando associada com membranas e vesículas sinápticas em neurônios, e envolvida no processo de regulação da exocitose. (39) Anos depois, foi identificada pela primeira vez uma interação entre duas septinas humanas: CDCrel-1 e KIAA0202 (um ano depois renomeado como SEPT8). (85-86) Foi mostrado que existe uma interação forte entre SEPT5 e SEPT8, uma vez que ensaios de duplo híbrido, *GST-pull-down* e imunoprecipitação mostraram a preferência de interação entre as duas proteínas, observando também que elas são expressas em tecidos de cérebro, coração e plaquetas. (85) Um estudo para entender quais são os domínios pelos quais SEPT5 e SEPT8 interagem para formar um complexo, mostrou que só o domínio GTPase é essencial para a formação do complexo (SEPT5-SEPT8). Por outro lado, os domínios C e N-terminal seriam importantes para formação de complexos homotípicos SEPT5-SEPT5 e SEPT8-SEPT8. (87) Ademais foi demonstrado que a ligação de GTP em SEPT5 é fundamental para interagir com SEPT8 e com ela mesma. Finalmente, quando expressas em células de mamíferos elas são co-localizadas. (87)

Baseado nestas observações e a importância destas proteínas, a dupla formada por SEPT5, que pertence ao grupo da SEPT2, e SEPT8, que pertence ao grupo da SEPT6, foi escolhida como modelo para determinar os fatores estruturais importantes que controlam a interface G entre septinas do grupo II e grupo III.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi determinar os fatores estruturais importantes para a especificidade da interface G entre SEPT5 e SEPT8 e expandir os resultados para as demais septinas dos grupos grupo III e grupo II respectivamente, tendo como base as Regras de Kinoshita.

2.2 Objetivos específicos

Fundamentado no objetivo geral, foram indicados os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Clonar as fases de leitura aberta dos genes *SEPT5* e *SEPT8* em vetores bicistrônicos de expressão, gerando construções com os domínios N-terminal, GTPase e C-terminal (NGC) e unicamente com o domínio GTPase (G).
- ✓ Co-expressar e co-purificar os complexos SEPT5-SEPT8(NGC) e SEPT5-SEPT8(G).
- ✓ Caracterizar os complexos utilizando espalhamento dinâmico de luz, ultracentrifugação analítica, espectropolarimetria de dicroísmo circular, fluorimetria de varrimento diferencial e termoforese em microescala.
- ✓ Cristalizar os complexos SEPT5-SEPT8.
- ✓ Realizar modelagem por homologia dos complexos SEPT2-SEPT6(G) e SEPT7-SEPT9(G) para determinar aminoácidos indispensáveis para a estabilidade das interfaces G.
- ✓ Fazer mutações nos aminoácidos identificados no item anterior no complexo SEPT5-SEPT8.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Definição dos domínios N-terminal, GTPase e C-terminal de SEPT5 e SEPT8

Septinas se caracterizam por seus três domínios: N-terminal, G central e C-terminal. Para iniciar os estudos, principalmente a clonagem dos genes, era necessário identificar cada um destes domínios dentro da sequência de aminoácidos das proteínas.

Usando a informação presente no banco de dados *Uniprot* foi possível identificar cada um destes domínios (como mostrado nas sequências embaixo). Com estes dados SEPT5 NGC (resíduos 1-369) apresentaria uma massa teórica de 42,7 KDa, SEPT5 G (resíduos 41-314) uma massa teórica de 31,6 KDa, SEPT8 NGC (resíduos 1-473) uma massa teórica de 54,5 KDa e SEPT8 G (resíduos 41-307) uma massa teórica de 29,6 KDa (Figura 13). Baseado nestas informações foram planejadas as clonagens dos domínios NGC e G de SEPT5 e SEPT8.

SEPT5

MSTGLRYKSKLATPEDKQDIDKQYVGFATLPNQVHRKSVKKGFDFTLMVAGESGLGKSTLV
HSLFLTDLYKDRKLLSAEERISQTVEILKHTVDIEEKGVKLKLTIVDTPGFGDAVNNTECWKPI
TDYVDQQFEQYFRDESGLNRNKIQDNRVHCCLYFISPFHGHLRPVDVGFMKALHEKVNIVPL
IAKADCLVPSEIRKLKERIREEIDKFGIHVYQFPECDSDEDEDFKQQDRELKESAPFAVIGSNT
VVEAKGQVRVGRLYPWGIVEVENQAHCDFVKLRLNMLIRTHMHDLKDVTCDVHYENYRAHC
QQMTSKLTQDSRMESPIPLPTPDAETEKLRMKDEELRRMQEMLQRMKQQMQDQ

SEPT8

MAATDLERFSNAEPEPRSLSLGGHVGFDSLDPQLVSKSVTQGFSFNILCVGETGIGKSTLTE
EASHHEACVRLRPQTYDLQESNVQLKLTIVDAVGFGDQINKDESYRPIVDYIDAQFENYLQE
ELKIRRSFLDYHDTRIHVCLYFITPTGHSLKSLDLVTMKKLDSKVNIPIIAKADTISKSELHKFKI
KIMGELVSNQVQIYQFPTDDEAVAEINAVMNAHLPFVAVGSTEEVKVGNKLVRRARQYPWGV
VQVENENHCDFVKLREMLIRVNMEDLREQTHSRHYELYRCKLEE MGFQSDSDGDSQPFSL
QETYEAKRKEFLSELQRKEEEMRQMFVNKVKETELELKEKERELHEKFEHLKRVHQEEKRK
VEEKRRLEEEETNAFNRRKAAVEALQSQUALHATSQQPLRKDKDKKNRSDIGAHQPGMSLSS
SKVMMTKASVEPLNCSSWWPAIQCCSCLVRDATWREGFL

■ N-terminal

■ G central

■ C-terminal

Figura 13 - Domínios estruturais, baseados na sequência, da SEPT5 e SEPT8.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2 Clonagem de SEPT5 e SEPT8 em vetores de expressão bicistrônicos

Com o objetivo de co-expressar os componentes do complexo SEPT5-SEPT8, ou na íntegra (com os três domínios, NGC) ou contando apenas o domínio GTPase (G), oligonucleotídeos específicos foram sintetizados baseados nas sequências de nucleotídeos dos genes *SEPT5* e *SEPT8* (com os códigos *GenBank*: NM_002688.5 e NM_015146.1 respectivamente). Estes oligonucleotídeos, além de ter a sequência complementar flanqueadora dos domínios de interesse, apresentam sítios de reconhecimento para as endonucleases de restrição *EcoRI*, *SaI*, *BglII* e *XhoI* (Tabela 1). Da lista de oligonucleotídeos presentes na tabela, os pertencentes ao domínio NGC de *SEPT8* foram sintetizados e gentilmente cedidos pela Dra. Joci N Macêdo.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados para a clonagem de *SEPT5* e *SEPT8*.

Nome do primer	Sequência
SEPT8NGC-For- <i>EcoRI</i>	5'-GGAATTCGATGGCGGCCACCGACC-3'
SEPT8NGC-Rev- <i>SaI</i>	5'-CGTCGACTTAGTTCTTCTTGTCTTGTCC-3'
SEPT8G-For- <i>EcoRI</i>	5'-GCGAATTCGAGCAAGTCGGTCACTCAGGGC-3'
SEPT8G-Rev- <i>SaI</i>	5'-GAGTCGACTCAGTCCTGAAAGCCCATCTCCTC-3'
SEPT5G-For- <i>BglII</i>	5'-GCAGATCTCCGCAAGTCGGTGAAGAAAGGC-3'
SEPT5G-Rev- <i>XhoI</i>	5'-GACTCGAGTCACAGTTTGCTGGTCATCTGCTG-3'

Fonte: Elaborada pelo autor.

Inicialmente o gene *SEPT8* NGC foi clonado no vetor pRSF-Duet-*SEPT5*(NGC) (*SEPT5* no sítio múltiplo de clonagem II - *MCSII*) cedido pela Dra. Joci N Macêdo. De tal modo, *SEPT8*(NGC) foi amplificado a partir de uma biblioteca de ADNc de cérebro fetal humano (*Invitrogen*) num termociclador *Mastercycler gradiente Eppendorf*. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi feita utilizando o kit *High fidelity PCR enzyme mix* da *ThermoScientific* (os detalhes da reação e as condições da PCR estão descritas na tabela 2). Para confirmar a amplificação do gene de aproximadamente 1290 pb, eletroforese em gel de ágarose 1% foi feito e

subsequente à confirmação o gene foi purificado com o kit *Wizard SV gel and PCR clean-up system* (Promega) segundo as recomendações do fabricante.

Tabela 2 - Detalhes da reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do gene *SEPT8*.

Mix de Reação da PCR		Condições da PCR			
10X Tampão <i>High Fidelity</i> <i>PCR</i> com 15 mM MgCl ₂	5 µl	Desnaturação inicial	94 °C	1,5'	1X
10mM dNTPs	1 µl	Desnaturação	94 °C	30''	
10mM SEPT8NGC-For- <i>EcoRI</i>	1 µl	Anelamento	- °C*	30''	35X
10mM SEPT8NGC-Rev- <i>SaII</i>	1 µl	Extensão	72 °C	1,5'	
ADN molde	1,0 µg	Extensão final	72 °C	10'	1X
<i>Taq High Fidelity PCR</i> <i>Enzyme Mix</i>	1 unidade				
Água	-				
Volumem final	50 µl				

Fonte: Elaborada pelo autor.

O fragmento purificado foi inserido no plasmídeo de propagação *pGEM-T Easy* (Promega) utilizando a enzima *T4 DNA Ligase* (Promega) para unir as regiões compatíveis entre o fragmento e o plasmídeo (a reação de ligação está detalhada na tabela 3). O produto da reação de ligação foi usado para transformar por choque térmico (88), células quimiocompetentes de *E. coli DH5-α*. Para avaliar a inserção do fragmento no plasmídeo, durante o plaqueamento das células foi utilizado X-Gal 0,1 mg/mL e IPTG 0,5 mM além do antibiótico de resistência (ampicilina 0,1 mg/mL).

Tabela 3 - Detalhe da reação de ligação de *SEPT8* em *pGEM-T Easy*.

Componentes da reação	
2X Tampão <i>Rapid Ligation</i> , <i>T4 DNA Ligase</i>	5 µl
<i>pGEM-T Easy Vector</i> (50ng)	1 µl
Produto da PCR	150ng
<i>T4 DNA Ligase</i> (3 U/µl)	1 µl
Água	-
Volumem final	10 µl

*A reação foi incubada por 16 horas a 4°C

Fonte: Elaborada pelo autor

Após 16 horas de incubação foram observadas colônias brancas e colônias azuis, das quais só as colônias brancas deveriam possuir o plasmídeo com o fragmento inserido. Foi extraído o ADN plasmidial de três colônias brancas escolhidas aleatoriamente para posterior confirmação por análise de restrição utilizando a endonuclease *EcoRI*. As amostras que liberaram um fragmento de aproximadamente 1290 pb foram preparadas para sequenciamento automático do ADN no sequenciador *ABI 3130x1 (Applied Biosystems)*. Os oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento foram o *SP6 (Reverse primer)* e *T73G (Forward primer)*, que são específicos para o plasmídeo *pGEM-T Easy*.

Comprovada a inserção do gene no *pGEM-T Easy*, 1 µg de DNA (*pGEM-T-SEPT8*) foi digerido com 1U de cada uma das enzimas *EcoRI* e *SaI* segundo o protocolo da tabela 4. Da mesma forma, 1 µg do plasmídeo *pRSF-Duet-SEPT5* foi digerido com 1U de cada uma das mesmas enzimas. O perfil de restrição foi analisado em gel de ágarose 1% e as bandas correspondentes aos fragmentos de interesse (1290 pb e 4914 pb, *SEPT8* e *pRSF-Duet-SEPT5* linearizado respetivamente) foram isoladas e purificadas utilizando-se o kit *Wizard SV gel and PCR Clean-up System (Promega)*.

Tabela 4 - Detalhes da reação de digestão

Componentes da reação	
10X Tampão O	2 µl
ADN	1 µg
<i>EcoRI</i> (10 U/µl)	1 µl
<i>SalI</i> (10 U/µl)	1 µl
Água	-
Volumem final	20 µl

*A reação foi incubada por 4 horas a 37°C

Fonte: Elaborada pelo autor.

Finalmente o gene *SEPT8* foi ligado no plasmídeo *pRSF-Duet-SEPT5* linearizado segundo o protocolo descrito na tabela 3. Após as 16 horas, a reação de ligação foi utilizada para transformar células quimiocompetentes de *E. coli DH5-α*. As células foram plaqueadas em LB sólido suplementado com o antibiótico kanamicina 30 µg/mL para a seleção das células transformadas. Posterior à incubação, 3 colônias foram selecionadas aleatoriamente e submetidas a análise de PCR de colônias e digestão com a endonuclease de restrição *PstI*. O plasmídeo final foi chamado de *pRSF-Duet-SEPT5-SEPT8(NGC)*.

Uma vez que trabalhar com complexos de septinas que apresentam os três domínios é complicado pela sua tendência a formar complexos oligoméricos de elevado peso molecular ou agregado proteicos, um complexo SEPT5-SEPT8 só com os domínios GTPase foi escolhido como alternativa para diminuir a dificuldade do estudo. Esta abordagem não cai fora do objetivo principal da pesquisa por que é esperado (segundo o observado no filamento SEPT2-SEPT6-SEPT7) que a interface de interação destas proteínas seja pelo domínio GTPase.

Baseado nestas observações, foram clonados os domínios GTPase de *SEPT5* e *SEPT8* no vetor bicistrônico *pET-Duet*. Ambos os domínios foram amplificados a partir do DNA plasmidial *pRSF-Duet-SEPT5-SEPT8* usando oligonucleotídeos específicos apresentados na tabela 1 e segundo o protocolo explicado anteriormente

(tabela 2). A temperatura de anelamento foi ajustado segundo as características dos oligonucleotídeos. Amplificados e purificados, os domínios foram ligados no plasmídeo de propagação *pGEM-T Easy* como descrito anteriormente.

Confirmada a inserção dos genes usando análise de restrição e sequenciamento, o domínio GTPase de *SEPT5* foi digerido com as endonucleases de restrição *Bgl*II e *Xho*I e inserido no *MCSII* do plasmídeo *pET-Duet* (também digerido com estas enzimas). Depois de confirmar a inserção do fragmento (*SEPT5G*) no plasmídeo, o domínio GTPase de *SEPT8* e o *pET-Duet-SEPT5* foram digeridos com as enzimas *Eco*RI e *Sal*I, e depois ligados com a enzima *T4 DNA Ligase*. Finalmente a inserção dos fragmentos foi confirmado com análises de restrição, PCR de colônias e sequenciamento. O plasmídeo final foi chamado de *pET-Duet-SEPT5-SEPT8(G)*.

3.3 Expressão dos complexos recombinantes em *E. coli Rosetta DE3*

Para a expressão das proteínas inteiras (*SEPT5-SEPT8(NGC)*), inicialmente uma colônia isolada de *E. coli Rosetta DE3* transformada com *pRSF-Duet-SEPT5-SEPT8* foi inoculada em 5 mL de meio LB suplementado com os antibióticos de resistência (canamicina 30 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL) e incubada a 37 °C, 80 rpm por 16 horas. Após incubação, dois inóculos foram transferidos para 1 litro de meio LB fornecido com os mesmos antibióticos e incubado a 37 °C, 150 rpm até atingir DO_{600nm} entre 0,5 e 0,7. Atingida a DO desejada, a expressão foi induzida com adição de 0,4 mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) e incubado à 20 °C por 16 horas e 150 rpm.

Cumpridas as 16 horas, as células foram coletadas por centrifugação a 4000 rpm por 45 minutos a 4 °C. Posteriormente, foram ressuspensas em 20 mL de tampão 3 (500 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM ácido glutâmico, 50 mM arginina, 10% glicerol, 5 mM β-Mercaptoetanol, pH = 7,8) e lizadas por ultrassonicação com 16 ciclos de 30 segundos e intervalos de 59 segundos. Com o intuito de separar a fração solúvel da insolúvel, o lizado celular foi centrifugado a 13000 rpm por 45 minutos a 4 °C. Finalmente a fração solúvel foi separada em um tubo falcon para posterior purificação.

A expressão do complexo *pET-Duet-SEPT5-SEPT8*, capaz de expressar os domínios GTPase da SEPT5 e SEPT8, foi realizada utilizando as mesmas condições, com diferença dos antibióticos de seleção (ampicilina 50 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL).

3.4 Purificação dos complexos SEPT5-SEPT8

Para purificar os complexos, foi utilizada a cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (*IMAC*) como o primeiro passo. Esta purificação foi facilitada pela inserção de uma cauda de 6xHis na proteína recombinante, a mesma que é proporcionada pelo *MCS-I* dos plasmídeos. No presente caso a cauda de histidinas está localizada na SEPT8 (em ambas construções).

A fração solúvel do complexo, SEPT5-SEPT8(NGC) ou SEPT5-SEPT8(G), foi aplicada numa coluna cromatográfica contendo 3 mL de resina *TALON® Superflow^{TM}* (GE Healthcare) equilibrada com 5X volumes de tampão 3. Após a ligação das proteínas na resina, duas lavagens foram feitas: a primeira com 10X volumes de tampão 3 e a segunda lavagem com 10X volumes de tampão 3 contendo 5 mM de imidazol. Posterior as lavagens, as proteínas foram removidas da resina com duas eluições de 2 mL de tampão 3 contendo 250 mM de imidazol e uma eluição com 2 mL de tampão 3 contendo 500 mM de imidazol.

Como segunda etapa de purificação foi utilizada a cromatografia de exclusão por tamanho ou exclusão molecular (*SEC*). Esta purificação permite separar os agregados proteicos, contaminantes e diversos estados oligoméricos presentes nas frações de eluição da prévia purificação. Assim, um volume de 2 mL do complexo purificado foi injetado numa coluna *HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade* previamente equilibrada com tampão 4 (500 mM NaCl, 20 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 50 mM ácido glutâmico, 50 mM arginina, 10% glicerol, 5 mM β-Mercaptoetanol, pH = 7,8) e acoplada num purificador *Äkta purifier* (GE Healthcare). A purificação foi realizada com uma eluição isocrática de 1,5X do volume total da coluna sob um fluxo de 1 mL/min, monitorando a presença das proteínas com absorbância a 280_{nm} e coletando frações de 1 mL.

Todas as frações coletadas tanto na purificação por cromatografia de afinidade quanto as da exclusão molecular foram analisadas por eletroforese usando gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) 10%. (89)

3.5 Obtenção de SEPT8G monomérica

Durante a purificação do complexo SEPT5-SEPT8(G), foi coletada uma fração que continha uma proteína com o tamanho estimado para uma septina no estado monomérico (aproximadamente 30 KDa). Com a eletroforese foi confirmado que esta proteína é SEPT8(G), que vem como excesso durante a purificação do complexo. Esta é uma amostra com a pureza suficiente para realizar estudos biofísicos e estruturais, e comparar com os resultados obtidos para o complexo.

3.6 Estimativa da massa molecular dos complexos SEPT5-SEPT8

A determinação da massa molecular aparente dos complexos SEPT5-SEPT8(NGC) e SEPT5-SEPT8(G) foi realizada por cromatografia de exclusão molecular em uma coluna *HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade* previamente equilibrada com o tampão 4, utilizando-se como padrões de massa molecular os disponíveis no kit *Gel Filtration Calibration Kits* (GE Healthcare).

Os padrões utilizados foram: 3 mg/mL de ribonuclease A (13,700 Da), 3 mg/mL de anidrase carbônica (29,000 Da), 4 mg/mL de ovalbumina (44,000 Da), 3 mg/mL de conalbumina (75,000 Da), 4 mg/mL de aldolase (158,000 Da) e 0,3 mg/mL de ferritina (440,000 Da). O Blue Dextran 2000 numa concentração de 1 mg/mL foi utilizado como padrão para determinar o volume de exclusão ou volume morto da coluna. Todas as amostras foram preparadas no tampão 4.

Um volume de 1 mL de cada padrão foi aplicado na coluna, utilizando uma eluição isocrática de 1,5X do volume total da coluna sob uma taxa de fluxo de 1 mL/min, monitorando a presença das amostras com absorbância a 280_{nm}.

Finalmente o volume de eluição dos padrões e dos complexos foram determinados e usados para o cálculo de K_{av} (coeficiente de partição) utilizando a seguinte equação:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_0} \quad (1)$$

onde: V_e é o volume de eluição de cada amostra,
 V_0 é o volume de exclusão da coluna,
 V_c é o volume total da coluna,

Os valores obtidos foram plotados num gráfico de K_{av} x $\log MW$ (logaritmo da massa molecular de cada amostra) no programa *Origin Pro 8* (OriginLab, Northampton, MA), para fins de calibrar a coluna.

3.7 Confirmação da identidade dos complexos SEPT5-SEPT8 por espectrometria de massas

Amostras dos complexos SEPT5-SEPT8(NGC) e SEPT5-SEPT8(G) foram submetidas a eletroforese usando gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) 10%. As bandas identificadas correspondentes a cada septina do complexo (pela comparação com o padrão de massa molecular) foram cortadas do gel e fragmentadas até obter pedaços menores, que foram colocados dentro de um *eppendorf* de 1.5 mL.

Foi aplicada em cada amostra fragmentada uma solução de 100 mM de bicarbonato de amônio e 50% de acetonitrila (ACN) até cobrir o gel, isto com a finalidade de remover o corante *Comassie Blue* e o SDS (este passo foi feito até tirar completamente a solução corante). Após descorar os fragmentos, foi adicionado ACN 100% para desidratação completa do gel (este passo foi feito duas vezes). A solução de ACN foi removida e as amostras foram submetidas à evaporação para tirar os restos de ACN presentes. Assim removida completamente a ACN, o gel foi reidratado com uma solução de 50 mM de bicarbonato de amônio (até cobrir o gel)

suplementado com 0,5 µg de tripsina (*Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade – Promega*) e incubado em gelo por 30 minutos. Passados os 30 minutos, foi adicionado um volume igual de 50 mM de bicarbonato de amônio e as amostras foram incubadas a 37 °C por 16 horas (esta etapa permite obter peptídeos a partir das proteínas clivadas pela enzima tripsina, os que serão posteriormente identificados usando espectrometria de massas).

Depois da incubação, foi adicionada uma solução de ácido fórmico 5% e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos (esta etapa é para interromper a atividade da enzima). Passados os 10 minutos as amostras foram rapidamente centrifugadas e o sobrenadante contendo os peptídeos foi transferido para um tubo novo. Em seguida foi adicionada uma solução de ácido fórmico 5% e ACN 50% sob o pellet obtido no passo anterior e as amostras foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. Novamente foram centrifugadas e o sobrenadante foi transferido ao microtubo que continha o sobrenadante do passo anterior. Finalmente os microtubos contendo os peptídeos foram concentrados em evaporador até um volume final de 100 µL e as amostras foram congeladas a -20 °C até as análises.

A análise das amostras foi feita usando LC-MS/MS em um espectrômetro de massa ESI-MicroTOF-Q II 10234 (Bruker Daltonics) e a identificação dos peptídeos foi feita com o programa MASCOT disponível no endereço eletrônico http://www.matrixscience.com/search_form_select.html. Estes procedimentos foram feitos com o auxílio do Dr. Edson Junior Crusca.

3.8 Caracterização biofísica

3.8.1 Análise da homogeneidade e de agregação dos complexos SEPT5-SEPT8(NGC) e SEPT5-SEPT8(G)

A estabilidade e pureza de uma proteína, pensando em relação das espécies moleculares presentes em solução e de tal modo em relação a sua heterogeneidade, é o principal determinante para o sucesso nos estudos biofísicos e estruturais. Embora seja verdade que análises de *native PAGE* e *SEC* permitem determinar os estados oligoméricos de proteínas ou a formação de complexos

oligoméricos, elas não apresentam a resolução suficientes para determinar com alta fidelidade a heterogeneidade de uma amostra, referido à existência de populações monoméricas, diméricas e até agregados proteicos na solução, por exemplo.

Assim foi utilizado espalhamento dinâmico de luz e ultracentrifugação analítica, para determinar com alta fidelidade a homogeneidade das nossas amostras em solução após o processo de purificação.

3.8.1.1 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Observações empíricas sugerem que macromoléculas que são monodispersas em solução apresentam uma maior tendência à cristalizar, enquanto agregados proteicos ou amostras polidispersas raramente alcançam o sucesso. O espalhamento dinâmico de luz (*DLS*, do inglês *Dynamic Light Scattering*) pode ser utilizado para rastrear condições nas quais amostras se encontram monodispersas, ou seja, condições com maior chances de sucesso em experimentos de cristalização, portanto, eliminar triagens em larga escala utilizando condições não favoráveis. (90)

O DLS é uma técnica que mede o coeficiente de difusão translacional (D) de uma macromolécula submetida a movimento Browniano (movimento aleatório de uma partícula produto do bombardeio das moléculas do solvente em sua volta). (90) Quanto maior o tamanho da partícula menor será seu movimento Browniano, por outro lado, moléculas menores apresentam maior movimento browniano. (91) Se há uma única espécie de moléculas em solução, o experimento fornece uma medida direta do D , embora a forma e densidade da macromolécula é normalmente desconhecido, seu raio hidrodinâmico (R_H) pode ser calculado usando a equação de *Stokes-Einstein*, e com isto sua massa molecular e estado oligomérico pode ser estimada:

$$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (2)$$

onde R_H é o raio hidrodinâmico, D é o coeficiente de difusão translacional, K é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta e η é a viscosidade. (91) O raio que é medido no DLS é um valor que se refere ao modo como uma partícula esférica se difunde num fluido por isso é referido como um raio hidrodinâmico. Tem que ser esclarecido que, o coeficiente de difusão translacional não depende só do tamanho da molécula mas também da sua superfície, da concentração dela na solução e os tipos íons presentes no tampão. (91)

A luz monocromática espalhada pelo movimento das partículas irá exibir flutuações na intensidade correspondentes ao movimento das partículas, e um decaimento na função de correlação do sinal da luz espalhada pode trazer informações quantitativas referentes ao comportamento das partículas dissolvidas na solução. (90) A correlação mede o grau de semelhança entre dois sinais ou um sinal com ela mesma em intervalos de tempo variáveis. Se a intensidade de um sinal (com flutuação aleatória) é comparada com ele mesmo em um tempo particular e em um tempo muito mais tarde, não haverá nenhuma correlação entre os dois sinais. Porém, se a intensidade de um sinal ao tempo t_0 é comparada com a intensidade da mesma em um tempo muito próximo ($t_0 + \delta t$), pode existir uma forte correlação entre os dois sinais, uma vez que a distribuição de partículas em solução quase não se alterou durante o período δt . A função de autocorrelação temporal é dada por: (92)

$$G(t) = \langle I(t_0) \rangle \langle I(t_0 + \delta t) \rangle \quad (3)$$

onde $I(t_0)$ é a intensidade de espalhamento em um determinado instante e $I(t_0 + \delta t)$ é o espalhamento em um instante imediatamente depois. Para partículas que são esféricas e monodispersas a função $G(t)$ é dada por: (92)

$$G(t) = A e^{-\Gamma t} + B \quad (4)$$

onde A e B são constantes e Γ é a constante de decaimento da curva exponencial gerada na função de correlação, sendo que: (92)

$$\Gamma = D q^2 \quad (5)$$

onde D é o coeficiente de difusão translacional e q é o vetor de onda de luz espalhada dada a sua vez por: (92)

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (6)$$

onde λ é o comprimento de onda da luz espalhada e θ é o ângulo de espalhamento da luz. Assim o que é obtido do experimento de DLS é o valor de Γ da função de correlação. A partir de Γ , D é calculado, e consequentemente o R_H . Por fim, a massa molecular pode ser estimada (considerando-a o máximo possível como uma esfera), e consequentemente o estado oligomérico em solução. (92)

Assim para analisar a homogeneidade e o estado oligomérico dos complexos SEPT5-SEPT8(NGC) e SEPT5-SEPT8(G), estudos de DLS foram feitos em um equipamento *Zetasizer μV* (Malvern Instruments) com um laser de 830 nm. Amostras a 1 mg/mL, em tampão 4 foram adicionadas a uma cubeta de quartzo de 2 μL e a luz espalhada foi medida a um ângulo de 90° e 22°. Os resultados foram analisados por meio do software *Zetasizer 6.32*.

3.8.1.2 Ultracentrifugação analítica (AUC)

A ultracentrifugação analítica (AUC) é uma técnica que permite realizar estudos de oligomerização e obter tanto parâmetros hidrodinâmicos quanto estudar as propriedades termodinâmicas de proteínas. Os experimentos de AUC são realizados em uma centrífuga equipada com um sistema óptico que permite detectar em tempo real a redistribuição das partículas em solução submetidas a uma velocidade angular constante. A AUC pode ser utilizada para realizar dois tipos de experimentos: Velocidade de sedimentação (SV), que mede o coeficiente de sedimentação, a massa molecular das espécies em solução e coeficiente de difusão, além da assimetria destas partículas através da determinação do coeficiente friccional; e Equilíbrio de Sedimentação (SE) que permite obter dados termodinâmicos como a densidade e constantes de dissociação de proteínas para sistemas homogêneos. (93)

A sedimentação das moléculas presentes em solução ocorre em uma velocidade angular constante (ω) fazendo-as sedimentar no fundo do tubo com uma velocidade constante v , dada pela equação 7:

$$v = \frac{[\omega^2 r m (1 - V_{bar} \rho_f)]}{f} \quad (7)$$

onde V_{bar} é o volume parcial específico da partícula, ρ_f a densidade do solvente, r o raio, m a massa da partícula e f o coeficiente de fricção (relacionado à média da assimetria das partículas em solução). (94) Se definimos a massa m como uma razão da massa molar (M) pelo número de Avogadro (N_{av}), obteremos a equação de Svedberg (8) rearranjando a equação 7 em função de v , ω e r :

$$\frac{M(1 - V_{bar} \rho_f)}{N_{av} f} = \frac{v}{\omega^2 r} = s \quad (8)$$

Desta forma, temos que o coeficiente de sedimentação (s) é dado pela velocidade linear de sedimentação da partícula por unidade de aceleração gravitacional, e a sua unidade no sistema internacional de medidas é o Sverdberg (S). Assim observamos que quanto maior a razão entre a massa molecular da partícula e o coeficiente de fricção, maior será o (s), ou seja, (s) é proporcional a massa e inversamente proporcional ao coeficiente de fricção. (94)

Uma vez que o coeficiente de sedimentação de uma partícula é regido pela densidade e coeficiente de fricção da partícula, é importante conhecer o coeficiente de difusão translacional (D) que é a velocidade da partícula em solução e que depende tanto do tamanho dela quanto das propriedades friccionais que experimenta no solvente. Assim temos que D está relacionado com a temperatura (T), constante de Boltzmann (K_B), constante dos gases (R) e o coeficiente friccional (f):

$$D = \frac{RT}{N_{av} f} = \frac{K_B T}{f} \quad (9)$$

O coeficiente friccional está relacionado não só com o tamanho da partícula, mediante o raio hidrodinâmico R_H , senão também com a viscosidade do solvente onde ela se encontra (η). Assim temos especificamente que o coeficiente de fricção de uma partícula em um determinado solvente é dado pela equação 10:

$$f = 6\pi\eta R_H \quad (10)$$

Na sua vez, o raio hidrodinâmico está relacionado tanto com o tamanho da partícula quanto com seu formato:

$$R_H = R_0 \frac{f}{f_0} \quad (11)$$

onde f / f_0 é o fator de Perrin associado à simetria da molécula e R_0 é o raio hidrodinâmico considerando a partícula como uma esfera perfeita. Finalmente a massa molecular da partícula pode ser estimada diretamente das medidas experimentais de s e D pela combinação das equações (8) e (9), gerando a equação Svedberg-Einstein:

$$M = \frac{sRT}{D(1 - V_{bar}\rho_f)} \quad (12)$$

O experimento de ultracentrifugação analítica gera curvas de sedimentação, de acordo com o tempo e a concentração das partículas. Essas curvas são analisadas através do programa *Sedfit* (95) que encontra os coeficientes de sedimentação e de difusão através da solução da equação de Lamm para cada curva de *input*:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} [rD \frac{\partial c}{\partial t} - s\omega^2 r^2 c(r, t)] \quad (13)$$

Esta equação descreve a distribuição de concentração ($c(r,t)$) das espécies, em função da posição radial (r) e tempo (t), baseado em o coeficiente de sedimentação (s) e de difusão (D), submetidas a uma velocidade de rotação constante (ω). (94)

Experimentos de velocidade de sedimentação foram realizados neste trabalho com o intuito de avaliar a homogeneidade das amostras (contendo os complexos) em solução. Os experimentos foram realizados pela aluna de mestrado Paola Lanzoni no LEC/LNBio, utilizando uma ultracentrífuga analítica Optima XL-A (Beckman-Coulter, Palo Alto, CA) equipada com um sistema de detecção de absorvância no UV-vis. Para o complexo SEPT5-SEPT8(NGC) a análise foi feita na concentração de 7,3 μM e para o complexo SEPT5-SEPT8(G) a concentração de 10 μM . As amostras foram submetidas a uma velocidade de rotação de 25 000 rpm a 20 °C e monitoradas a 280 nm. O estudo foi realizado tendo como referência uma cela onde somente se encontrava tampão da própria amostra, que foi submetida a dialise em membrana de poro 12 KDa sob agitação durante 16h a 4 °C.

Os parâmetros de V_{bar} , η e ρ_f foram calculados utilizando o programa SEDNTERP (96) e os dados de velocidade de sedimentação foram tratados usando o programa *Sedfit*. Os coeficientes de sedimentação foram obtidos usando o modelo “*Continuous c(S) Distribution model*” que calcula a distribuição do coeficiente de sedimentação das espécies presentes em solução levando em conta seu coeficiente de difusão. Para a obtenção das curvas, a razão friccional (f/f_0) não foi fixada, mas sim o valor do V_{bar} (0,73507, obtido do SEDNTERP a partir da sequência de aminoácidos da SEPT5 e SEPT8) (96), para cada complexo (foi utilizado um grau de confiança nas análises de 0,90). Com estas análises foi possível determinar o coeficiente de sedimentação (s) e a massa molecular da proteína (MM) de cada espécie da amostra. A correção de “ s ” foi feita diretamente no SEDFIT onde o valor de s foi transformado para $s_{20,w}$, que é a correção para a mesma molécula considerando-se a mesma submetida ao experimento em água a 20 °C. Este procedimento permite retirar as influências do tampão da análise.

Para determinar o estado oligomérico das espécies em solução, os valores de $s_{20,w}$ e MM obtidos experimentalmente foram comparados com os valores teóricos. Os valores teóricos de $s_{20,w}$ para monômeros, dímeros e tetrâmeros de cada um dos complexos foram calculados utilizando as equações (8), (10), (11) e (12) e dos parâmetros de V_{bar} (obtido do SEDNTERP) e f/f_0 (obtido do *Sedfit*).

3.8.2 Análise do conteúdo de nucleotídeos

Buscando constatar a presença e natureza de nucleotídeos ligados no heterocomplexo SEPT5-SEPT8(G) e em SEPT8(G), amostras foram submetidas para análise de liberação de nucleotídeo por meio da desnaturação química com ácido perclórico segundo o protocolo descrito por Seckler e colaboradores, com algumas modificações. (97)

Assim, 500 µL do complexo SEPT5-SEPT8(G) e de SEPT8(G) em uma concentração de 50 µM foram incubados com 250 µL de ácido perclórico HClO₄ 1,5M (gelado) por 10 minutos em gelo para desnaturar da proteína e, por conseguinte liberar os nucleotídeos presentes (se houverem). Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 13 000 x g por 10 minutos a 4°C para separar a fração desnaturada da fração solúvel contendo os possíveis nucleotídeos. Após isso, 600 µL da fração solúvel foi transferido para um novo microtubo onde foi adicionado 100 µL de K₂HPO₄ 1M, 100 µL de KOH 3M e 80 µL de ácido acético 5M para a precipitação do sal KClO₄ presente e também para neutralizar o pH (todas as soluções geladas). Em seguida, foram incubadas a -20°C por pelo menos 1 hora e por fim descongeladas e centrifugadas por 10 minutos a 13 000 x g a 4°C.

Uma alíquota de 200 µL foi extraída e aplicada em uma coluna de troca iônica *Protein Pack DEAE-5PW*, 7,5 x 7,5 mm (*Waters*) acoplada a um cromatógrafo *Alliance 2695*, sob monitoramento da absorbância no comprimento de onda de 253 nm. Foram utilizados padrões de 25 µM de GTP e GDP diluídos no mesmo tampão da proteína (tampão 4) e submetidos ao mesmo tratamento de desnaturação com ácido perclórico (uma amostra contendo só tampão foi submetido ao tratamento da mesma forma). Os tampões empregados para a cromatografia foram tampão A (Tris-HCl 25 mM, pH 8.0) e tampão B (Tris-HCl 25 mM, pH 8.0, acrescido com 1 M de NaCl). As condições do gradiente de NaCl estão descritas na tabela 5.

Tabela 5 - Gradiente de NaCl utilizado na cromatografia de troca iônica

Tempo (minutos)	% Tampão A	% Tampão B
0	90	10
1	90	10
10	55	45
11	0	100
14	0	100
15	90	10
17	90	10

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.8.3 Avaliação da ligação dos nucleotídeos GTP e GDP para SEPT8(G) usando Termoforese em Microescala (MST)

O reconhecimento molecular está relacionado com os processos biológicos nos quais, as macromoléculas biológicas interagem entre si ou com pequenas moléculas através de interações não covalentes até formar um complexo específico. (98) As principais características do reconhecimento molecular são especificidade e afinidade. A especificidade é capacidade de distinguir padrões de ligação altamente específicos dos pouco específicos. A afinidade, determina que uma molécula com baixa afinidade (e presente em alta concentração) não consiga competir, ou ter o mesmo efeito, que uma molécula em baixa concentração e alta afinidade, ambas frente ao mesmo alvo. (99)

Proteínas são macromoléculas biológicas de importância fundamental porque estão envolvidas em efetivamente todos processos celulares. Elas cumprem suas funções através de interações físicas diretas com outras moléculas, denominadas ligantes (sejam macromoléculas ou pequenas moléculas). (100) Portanto, para entender como as proteínas funcionam, entre outras coisas, temos que compreender os mecanismos responsáveis das interações proteína-ligante. Estes mecanismos

são governados por uma rede complexa de interações, formando estados de energia diferentes. As interações que formam estados de menor energia livre, serão também as interações mais estáveis frente ao tempo.

Uma vez que SEPT8(G) monomérica está presente na sua forma apo, experimentos para conhecer as constantes de dissociação tanto para o GTP quanto para o GDP foram feitos utilizando termoforese em microescala (MST).

A termoforese descreve o movimento direto de moléculas através de um gradiente de temperatura e foi descrita inicialmente por Carl Ludwing em 1856. Recentemente, a termoforese em microescala surgiu como uma técnica para monitorar o movimento direto de moléculas fluorescentes submetidas a um gradiente microscópico de temperatura em micro volumes, permitindo uma análise precisa dos eventos de ligação em uma solução que pode apresentar qualquer tipo de molécula (independentemente do seu tamanho ou propriedades físicas). A MST detecta mudanças na camada de solvatação de biomoléculas além das mudanças no tamanho produzida pelos eventos de ligação. Esta ligação pode ser do tipo proteína-proteína, de pequenas moléculas para proteínas, substratos a enzimas e até ligantes para lipossomos. A técnica também oferece uma vantagem frente a técnicas convencionas como ITC ou SRP uma vez que não é necessário imobilizar moléculas nem precisa de grandes quantidades de amostra. (101)

A termoforese pode ser entendida como um fluxo molecular, que é diretamente proporcional a um gradiente de temperatura com um D_T (coeficiente de difusão termal) proporcionalmente constante:

$$j = -cD_T(\text{grad } T) \quad (14)$$

onde j é o fluxo molecular, c a concentração da molécula, D_T o coeficiente de difusão termal e $\text{grad } T$ gradiente de temperatura.

Durante o estado de repouso ou estável/constante, o fluxo termoforético é contrabalançado pela difusão da massa:

$$j = -D(\text{grad } c) \quad (15)$$

onde D é o coeficiente de difusão e $\text{grad } c$ é o gradiente de concentração da molécula.

As mudanças na concentração induzidas pela termoforese são logo determinadas pela relação entre D e D_T que é referida como coeficiente de Soret (S_t):

$$S_T = \frac{D}{D_T} \quad (16)$$

Para uma determinada diferença de temperatura espacial (ΔT), a mudança da concentração do estado em repouso é, portanto, dada por:

$$\frac{c_{\text{quente}}}{c_{\text{frio}}} = \exp(-S_T \Delta T) \quad (17)$$

c_{quente} é a concentração de moléculas na área quente e c_{frio} a concentração de moléculas na área fria. A diminuição termoforética depende da interface entre a molécula e o solvente. Em condições constantes do tampão, a termoforese examina o tamanho, carga, entropia de solvatação e conformação das moléculas. Como eventos de ligação comumente afetam alguns destes parâmetros, a termoforese pode ser usada como uma ferramenta flexível para distinguir entre os estados apo e holo de uma proteína e assim quantificar a afinidade entre biomoléculas.

Durante o experimento é visível uma série de processos definidos e separáveis, cada um contendo informação diferente sobre o evento de ligação (Figura 14). Para derivar as constantes de ligação, capilares com uma concentração constante da molécula marcada com um fluoróforo (por exemplo NT647-NHS, Nanotemper) e um gradiente de concentração do ligante (ou molécula não marcada) são sondados consecutivamente com a excitação por *laser* e detecção através da fluorescência do fluoróforo no comprimento de onda apropriado, no nosso caso 650 nm. Mudanças na termoforese das moléculas marcadas produto da ligação pode ser usado para calcular as constantes de dissociação da ligação (Figura 14B). Antes de

ligar o *laser*, a fluorescência inicial é coletada, onde ela deveria ser constante para todas as amostras (Figura 14C).

Figura 14 – Passos do experimento da Termoforese em Microescala. A) O Monolith NT.115 onde é realizado o experimento, em baixo a plataforma onde são colocados os 16 capilares. B) Sistema óptico do MST. O *laser* infravermelho é focado sobre os capilares com uma objetiva e a fluorescência emitida pelas amostras é detectada pela mesma. C) Sinal observado durante o experimento. Antes de ligar o *laser*, a fluorescência é detectada mostrando que a distribuição das moléculas é homogenia. Após de ligar o *laser*, ocorre um salto na temperatura (T-jump) e se produz um gradiente de temperatura que permite observar a termoforese. O *laser* é desligado e as moléculas voltam para a etapa inicial. D) Sinal de um típico experimento de ligação.

Fonte: Adaptada de JERABEK-WILLEMSEN et al. (101)

Um laser infravermelho com emissão em 1480 nm é focado através de uma objetiva sobre os capilares para produzir um gradiente de temperatura microscópico (Figura 14B), quando ligado o laser infravermelho ocorre uma mudança abrupta na intensidade da fluorescência, isto é nomeado salto da temperatura (T-jump) o que corresponde à mudança de fluorescência dependente da temperatura (Figura 14C). A T-jump ocorre no mesmo tempo extremadamente curto (100 ms) em que a amostra é submetida a um gradiente de temperatura de aproximadamente 3 graus pelo laser infravermelho. A T-jump pode ser facilmente separada da seguinte região, a termoforese, que é um processo lento e limitado pela difusão, onde se cria um

gradiente de concentração das moléculas fluorescentes (Figura 14C). Após um tempo (aproximadamente 30 segundos na figura 14C), a intensidade de fluorescência atinge um platô representando o estado em repouso em que a termodifusão é contrabalanceada pela difusão de massa. Após este período, quando já existe um equilíbrio frente a esse gradiente, o laser é desligado e a fluorescência é recuperada devido à dependência da temperatura por parte dos fluoróforos, o T-jump é invertido indicando que a amostra está retornando à temperatura inicial. Finalmente, a difusão inversa direcionada puramente pela difusão de massa, conduz à compensação do gradiente de concentração (Figura 14C). Ao ligarem as duas moléculas, o complexo resultante tem uma massa maior que a molécula marcada original. Sendo assim, a difusão destes complexos fora da região de monitoramento é mais lenta. Consequentemente a fluorescência decai mais lentamente em função do tempo (Figura 14D). (101-102)

Os experimentos de MST foram realizados no LEC/LNBio pela aluna de mestrado Paola Lanzoni. SEPT8(G) foi marcada usando o fluoróforo NT-647-NHS (Nanotemper) alcançando uma concentração final de 29 nM de SEPT8(G) marcada nos capilares e diluições seriadas em razão de 1:1 dos nucleotídeos (GTP e GDP) e tampão foram realizados 16 vezes, sendo que a concentração inicial de GTP foi de 9mM e para GDP de 6,25 mM. Todos os experimentos foram feitos utilizando o tampão recomendado para o equipamento sendo ele composto por Tris 50mM pH 7,4, NaCl 150mM e MgCl₂ 10mM.

A análise foi feita em um *NanoTemper Monolith NT.115* usando como fonte de luz LED a 30% de sua intensidade máxima e MST Power de 20% sendo que o pulso do *laser* infravermelho apresentou uma duração de 30 s. Os dados de fluorescência foram normalizados (Fnorm) como descrito por Seidel e colaboradores. (102)

3.8.4 Análise do enovelamento do complexo SEPT5-SEPT8(G) e SEPT8(G) com espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD)

Dicroísmo circular (CD, do inglês *Circular Dichroism*) é um método espectroscópico óptico que utiliza a absorção diferencial da luz circularmente

polarizada à direita e à esquerda por moléculas opticamente ativas presentes em uma solução, com a finalidade de determinar as suas configurações absolutas. (103)

A luz plano polarizada pode ser descrita como a sobreposição da luz polarizada circularmente em sentido oposto de igual amplitude e fase, ou seja, dois componentes circularmente polarizados: uma à direita (RCP) e outro à esquerda (LCP). Enquanto as amplitudes e as fases dos componentes circulares continuam sendo os mesmos, o vetor elétrico resultante (E) se encontra em um plano e oscila em magnitude como mostrado na figura 15A. Quando a luz atravessa alguma amostra opticamente ativa, esta amostra pode absorver diferencialmente os dois componentes circularmente polarizados e a radiação resultante é chamada de polarizada elipticamente com um vetor elétrico traçando uma elipse (figura 15B). (103)

Figura 15- Decomposição do feixe de luz plano polarizado. A) componentes planos polarizados à direita (R) e à esquerda (L) antes de atravessar uma amostra. O vetor elétrico é mostrado em seta pontilhada. B) componentes planos polarizados depois de atravessar uma amostra opticamente ativa, o vetor elétrico traça uma elipse.

Fonte: Adaptada de MILES et al. (103)

O espectro CD é derivado da diferença de absorção da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda emergente de uma amostra opticamente ativa. Um cromóforo é opticamente ativo quando é quiral, covalentemente ligado a um centro quiral ou está situado em um ambiente quiral proporcionado a partir da estrutura tridimensional da molécula. A última situação pertence a ligação peptídica, que é o cromóforo principal de interesse em proteínas e que absorve a luz abaixo de 240 nm. Um cromóforo absorve radiação eletromagnética quando os elétrons são

elevados de um estado de energia para um outro de maior energia. A ligação peptídica apresenta dois estados de transição no UV – distante: uma transição $n \rightarrow \pi^*$ a ~ 220 nm e outra $\pi \rightarrow \pi^*$ a ~ 190 nm.

Quando é empregado para análise de proteínas, o CD no intervalo de comprimento de onda da luz visível (UV) - distante do espectro eletromagnético (260 – 170 nm), pode ser usado para caracterizar e quantificar o conteúdo da estrutura secundária em termos de hélice- α , folha- β e estruturas desordenadas ou não estruturadas. Os sinais de CD aumentam - assumem valores mais positivos ou negativos – em comprimentos de onda onde ocorre absorção da radiação diferenciada para luz RCP e LCP. A banda espectral é facilmente atribuída a uma estrutura secundária característica conhecendo os espectros padrão para cada uma delas (figura 16). O espectro de uma proteína- α (dominada por hélice- α), apresenta uma transição negativa a 222 nm (que corresponde a $n \rightarrow \pi^*$) e outro em 208 nm seguindo de um pico positivo em 192 nm (figura 16, linha sólida). O espectro para uma proteína- β predomina uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$ com magnitudes que são tipicamente três ou cinco vezes mais fracas que as geradas por hélice- α (figura 16, linha pontilhada). Proteínas que são predominantemente desordenadas tem um sinal que decai para valores mais baixos, chegando a ser negativos em comprimentos de onda abaixo de 200 nm (figura 16, linha com trajetos longos).

Figura 16 - Espectro de CD no UV-distante. Espectro CD de proteína hélice- α (Linha sólida), espectro CD de proteína folha- β (linha pontilhada) e espectro CD de proteína desordenada (linha com trajetos longos).

Com esta técnica é possível detectar mudanças razoáveis que ocorrem durante interações com ligantes ou outras moléculas e monitorar quais fatores ambientais alteram as estruturas de proteínas como o pH ou força iônica.

O complexo SEPT5-SEPT8(G) e SEPT8(G) purificados com tampão 4, foram dialisados em tampão fosfato de sódio pH 7,8, contendo 100 mM de NaCl e 5% de glicerol. Posteriormente foram diluídos para uma concentração de 0,1 mg/mL e finalmente centrifugados a 10 000 rpm, 4 °C por 10 minutos com fins de remover impurezas ou precipitados proteicos.

Os espectros de CD foram obtidos em um espectropolarímetro *Jasco J-815 CD Spectrometer* (Toquio, Japão) do Grupo de Biofísica do Instituto de Física de São Carlos, monitorando no intervalo de comprimento de onda 195 – 270 nm, com uma resolução de 0,5 nm, a 10 °C e utilizando uma cubeta de 0,1 cm de caminho óptico. Os espectros finais foram promediações de oito varreduras a uma velocidade de 50 nm/min. Os espectros foram convertidos para elipticidade molar média por resíduo (MRW- *Mean Residue Weight*) de acordo com a equação (18):

$$\theta_{MRW,\lambda} = \frac{MRW \times \theta_{\lambda}}{10 \times d \times c} \quad (18)$$

onde $MRW = M/(N-1)$, sendo M a massa molecular da proteína em Dalton e N o número de aminoácidos. θ_{λ} consiste na elipticidade observada (graus) no comprimento de onda λ , d corresponde ao caminho óptico (em cm) e c à concentração da proteína (g/mL).

3.8.5 Estabilidade térmica do complexo SEPT5-SEPT8(G) e SEPT8(G)

Muitas aplicações que permitem determinar a atividade, estrutura ou interações de proteínas, precisam que elas sejam estáveis por longos períodos de tempo. A estabilidade de uma proteína num ambiente específico, também está relacionada com a prevenção à desnaturação no momento de armazenamento. Igualmente, algumas proteínas exibem uma tendência de formar agregados quando

este ambiente é alterado (decrece as condições de estabilidade). Portanto, identificar as condições de estabilidade poderia ajudar em aumentar as probabilidades de êxito em experimentos que envolvem técnicas analíticas, biofísicas e estruturais que precisam de altas concentrações de proteínas e que são sensíveis a agregados proteicos. (104)

A estabilidade de uma proteína está relacionada com sua energia livre de Gibbs para o desenovelamento (ΔG_u), a qual é dependente da temperatura. (105) A estabilidade de muitas proteínas decresce com aumentos na temperatura, onde a ΔG_u decresce até chegar a zero e as concentrações de proteínas enoveladas e desenoveladas são iguais. A temperatura neste ponto é chamada como de *Temperatura de Melting* (T_m). (104) Quando uma proteína sofre um aumento na ΔG_u , portanto aumento na T_m , podemos relaciona-lo com um aumento na sua estabilidade.

Para os estudos de estabilidade do complexo SEPT5-SEPT8(G), foram utilizadas as técnicas de Fluorimetria Diferencial de Varredura (DSF, do inglês *Differential Scanning Fluorimetry*) ou também chamada *Thermofluor* e a Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular (CD) em função da temperatura. Ambas técnicas analisam a estabilidade da proteína em função da temperatura.

3.8.5.1 Fluorimetria diferencial de varredura (DSF)

A caracterização de proteínas precisa, comumente, de quantidades além do que uma célula poderia suportar e por isso é empregada a expressão recombinante para sua obtenção. Quando são isoladas, os ambientes receptores (tampão) devem garantir potencialmente a estabilização das amostras. No entanto, muitas proteínas experimentam uma reduzida estabilidade e conseqüentemente problemas no desempenho de sua função em condições padrões de tampão. Portanto, é necessário identificar ambientes e componentes essenciais para garantir a integridade e atividade ideal das proteínas, para contribuir ao entendimento adequado das suas funções. (106)

Estudos estruturais são especialmente exigentes, porque a amostra precisa permanecer estável sob condições experimentais estressantes. Para cristalizar, amostras altamente concentradas são necessárias e a cristalização pode tomar desde várias horas até semanas. Comumente a cristalização é feita a temperatura ambiente, 4 °C ou 18 °C, mas muitas proteínas não são estáveis nestas temperaturas por longos períodos de tempo. A termoestabilidade é uma característica importante que precisa ser testada, uma vez que a identificação de uma solução (tampão) que garante a estabilidade facilita a purificação, concentração e cristalização de uma proteína. (106)

DSF é uma técnica que monitora a desnaturação térmica das proteínas na presença de um marcador fluorescente que se liga com mais alta afinidade ao estado desenovelado e que é realizada tipicamente usando um instrumento de PCR em tempo real. (107) É excelente para realizar uma varredura de condições que estabilizam a proteína de interesse, devido as pequenas quantidades e baixas concentrações de proteína requerida. Nesta técnica, a intensidade da fluorescência é plotada em função da temperatura, gerando uma curva que pode ser descrita por dois estados (figura 17). O ponto de inflexão da curva de transição (T_m , *Temperatura de Melting*) é calculado usando uma equação simples como a equação de Boltzmann:

$$y = LL + \frac{(UL - LL)}{1 + \exp\left(\frac{T_m - x}{a}\right)} \quad (19)$$

onde LL e UL são valores mínimos e máximos de intensidade, respectivamente, e a denota a inclinação da curva na temperatura T_m . (104)

Figura 17 - Gráfico da intensidade de fluorescência frente à temperatura para a desnaturação térmica de uma proteína em presença de SYPRO Orange. A proteína alcança o estado desenovelado na região UL para depois experimentar um estado de agregação que conduz à queda da intensidade (região final do gráfico).

Fonte: Adaptada de NIESEN et al. (104)

Os marcadores fluorescentes utilizados para DSF devem ser altamente fluorescentes em ambientes não polares, como as regiões hidrofóbicas de proteínas desenoveladas, em comparação com a solução aquosa onde a fluorescência é ausente. O melhor até a data é o SYPRO Orange (*ThermoFisher Scientific*), devido a sua elevada relação sinal-ruído. Este composto apresenta especificidade para ativar a fluorescência quando liga as regiões hidrofóbicas expostas das proteínas, como resultado das mudanças conformacionais durante a desnaturação. Também apresenta um comprimento de onda de excitação muito diferente do usado para monitoramento das ligações peptídicas (280nm), perto dos 500 nm, o que diminui a probabilidade de que pequenas moléculas da solução interfiram com as propriedades ópticas do marcador e cause, por exemplo, extinção da intensidade da fluorescência. (104)

Para analisar a termoestabilidade de SEPT5-SEPT8(G) e SEPT8(G) no tampão de purificação (tampão 4), amostras na concentração de 10 μ M foram marcadas com a sonda SYPRO orange (em uma concentração final de 50X) para

um volume final de 50 μL para cada amostra. As amostras foram preparadas segundo o protocolo descrito por *Ericsson* e colaboradores. (108) Foi feito um gradiente de temperatura de 25 a 95°C com uma taxa de 1°C por minuto. O monitoramento da intensidade de fluorescência foi realizado em um termociclador CFX96 Real-Time (Bio-Rad) usando os comprimentos de onda para absorção e emissão de 470 e 569 nm, respectivamente. (106) As medidas foram feitas em duplicata para cada concentração testada e a análise de desnaturação térmica junto com a obtenção da T_m foram realizadas com a planilha Excel DSF *analysis tool*.

3.8.5.2 Espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD)

A mudança no sinal de CD em função da temperatura, em um comprimento de onda específico, pode ser utilizada para determinar a termodinâmica do desenovelamento de uma proteína obtendo a ΔH e a ΔS do estado desenovelado, no ponto médio da transição entre o estado enovelado e desenovelado (T_m). Também permite determinar a energia livre de Gibbs para o desenovelamento (ΔG_u). Quando a T_m aparente muda em função da concentração da proteína ou é perturbada por mudanças na concentração de sal ou o pH do tampão, mudanças na capacidade calorífica (ΔC_p) também podem ser determinadas a partir dos espectros CD. Igualmente, as análises do espectro CD em função da temperatura podem ser usadas para determinar a existência de estados desenovelados intermediários. (109)

No caso mais simples uma molécula sofre uma transição ao estado desenovelado através de dois estados: enovelado (F) e desenovelado (U). Em qualquer temperatura (T), a constante de enovelamento é:

$$K = \frac{[F]}{[U]} \quad (20)$$

onde [F] e [U] são as concentrações das formas enoveladas e desenoveladas respectivamente. A fração enovelada a qualquer temperatura é α :

$$\alpha = \frac{[F]}{([F]+[U])} \quad (21)$$

$$\alpha = \frac{(\theta_t - \theta_U)}{(\theta_F - \theta_U)} \quad (22)$$

onde θ_t é a elipticidade a qualquer temperatura t , θ_F é o valor da elipticidade do estado totalmente enovelado e θ_U é o valor da elipticidade do estado totalmente desenovelado. Quando $\alpha = 0,5$, exatamente a metade das moléculas presentes em solução estão no estado desenovelado, o que acontece na temperatura de melting T_m . (109)

Com o objetivo de analisar o efeito da temperatura sobre o enovelamento, e a obtenção da T_m , do complexo SEPT5-8(G) e SEPT8(G), amostras nas mesmas condições relatadas no item 3.8.4 foram submetidas a um gradiente de temperatura de 10°C a 70°C, com incrementos de 2°C e com equilíbrio de 1 minuto antes de cada medida e o sinal de CD medido a 222 nm. Após atingir 70°C, o espectro completo de CD foi medido novamente com a finalidade de avaliar a estado de enovelamento das amostras, uma vez que é relatado que septinas quando são submetidas a altas temperaturas apresentam tendências para formar filamentos amiloides. (49)

Para a construção das curvas de desnaturação, o mínimo situado em $\theta = 222$ nm foi monitorado e as curvas foram expressas em termos de fração de proteína desnaturada (f_D), de acordo com a seguinte equação:

$$f_D = \frac{\theta_{obs} - \theta_{t0}}{\theta_{tf} - \theta_{t0}} \quad (23)$$

onde: θ_{obs} é o valor da elipticidade medida ao longo da variação

θ_{tf} é o valor da elipticidade em 70°C

θ_{t0} é o valor da elipticidade em 10°C

3.8.6 Ensaios de cristalização e coleta de dados do complexo SEPT5-SEPT8(G)

Os ensaios de cristalização foram realizados inicialmente pelo método de vapor difusão em gota sentada. O *screening* inicial foi realizado empregando os *kits* comerciais *MORPHEUS* (*Molecular Dimensions*) e *JCSG + Suite* (*Qiagen*) em um

robô de cristalização *Honeybee 931* (*Genomic Solutions Inc.*) com placas de 96 poços e em três concentrações diferentes de proteína (2,5, 3,0 e 3,5 mg/mL) por cada *kit*. As placas montadas foram incubadas a 18°C.

As condições onde houveram crescimento de cristais foram selecionadas para refinamento das mesmas. O refinamento das condições foi feito manualmente em uma placa de 24 poços utilizando o método de vapor difusão em gota pendurada e variando principalmente a concentração do agente precipitante e o pH do tampão da solução de cristalização (solução do poço). Assim, foram montadas lamínulas com gotas na proporção 1:1 de proteína em tampão 4 e a solução do poço, em seguida foram colocadas sobre o poço (o qual foi engraxado para vedar o sistema e assim permitir a troca de vapor e, eventualmente a formação de cristais). O refinamento das condições de cristalização está resumido nas tabelas 6 e 7.

Após 72 horas a 18°C os cristais obtidos no *screening* foram cuidadosamente congelados em nitrogênio líquido e transportados para o sincrotron *Diamond Light Source* (Oxfordshire, Inglaterra). Os dados foram coletados usando a linha I04.

Tabela 6 - Condições de cristalização kit MORPHEUS

MORPHEUS							
%precipitante: PEG 4000							
		6%	8%	10%	12%	14%	16%
pH	7,1	A1	A2	A3	A4	A5	A6
	7,3	B1	B2	B3	B4	B5	B6
	7,5	C1	C2	C3	C4	C5	C6
	7,7	D1	D2	D3	D4	D5	D6

*Condição G7: 10% PEG4000, 20% glicerol, 0.02 M ácidos carboxílicos, 0.1 M MOPS/HEPES-Na pH 7.5

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 7 - Condições de cristalização kit JCSG + Suite

JCSG + Suite							
%precipitante: 10% Isopropanol							
	6%	8%	10%	12%	14%	16%	
pH	7,1	A1	A2	A3	A4	A5	A6
	7,3	B1	B2	B3	B4	B5	B6
	7,5	C1	C2	C3	C4	C5	C6
	7,7	D1	D2	D3	D4	D5	D6
*Condição E3: 0.2 M Cloreto de sódio, 0.1 M HEPES pH 7.5, 10% isopropanol.							

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.9 Modelagem por homologia

Existe um paradigma no estudo de proteínas que fala da relação que existe entre a sequência de uma proteína e a sua estrutura tridimensional, devido a que uma proteína pode realizar corretamente sua função biológica só em um único estado de enovelamento, o qual é efetivamente determinado pela sequência de aminoácidos. (110) Deste modo, conhecer a estrutura tridimensional de uma proteína fornece informação importante para inferir sua função dentro da célula.

A dificuldade para determinar experimentalmente a estrutura de uma proteína, enfatizada pela discrepância entre o número de sequências obtidas com projetos de genomas e o número de estruturas disponíveis no PDB, motivou aos pesquisadores na criação de métodos computacionais para a determinação (predição) da estrutura delas, apenas a partir das suas sequências. Nas últimas décadas foram desenvolvidas diversas metodologias para a predição da estrutura de proteínas, dentro delas a modelagem comparativa ou modelagem por homologia que é uma das mais utilizadas pela rapidez, precisão e fidelidade na predição da estrutura. (111) A modelagem por homologia constrói um modelo teórico para a estrutura da proteína comparando a sequência da proteína de interesse com uma proteína relacionada evolutivamente e que apresenta a sua estrutura tridimensional conhecida (*template*). Portanto o pré-requisito para esta metodologia é uma proteína

homóloga com estrutura caracterizada previamente por métodos experimentais. (112) Por estas proteínas serem relacionadas evolutivamente (portanto homólogas), a estrutura da proteína de interesse é similar à estrutura do *template* (com o qual os aminoácidos na nova estrutura ocuparão posições equivalentes e em geral compartilharão ambientes físico-químicos parecidos). (113) Os passos básicos para obter a estrutura de uma proteína por modelagem por homologia estão descritos na figura 18.

Figura 18 - Passos para a predição da estrutura de uma proteína utilizando modelagem por homologia.

Fonte: Adaptada de BISHOP et al. (125)

Uma vez que a modelagem é baseada na similaridade de sequências de aminoácidos, a porcentagem de identidade entre as sequências a ser modelada e a sequência do *template* pode ser utilizada como indicador da qualidade do modelo esperado, sendo que: 50% de identidade nas sequências permite obter modelos com alta precisão, onde o erro entre as cadeias principais do modelo e o *template*

varia aproximadamente 1 Å (RMSD), entre 30 – 50% de identidade são obtidas estruturas com precisão média, onde o 90% da cadeia principal do modelo apresenta um desvio de 1,5 Å sobre o molde e finalmente com menos do 30% de identidade são obtidas estruturas com baixa precisão. (114) Com isto, estruturas modeladas com alta precisão podem ser utilizadas para o desenho de fármacos, *screening* virtual de fármacos e para planejamento de mutagêneses sitio dirigida. Por outro lado, modelos obtidos com baixa precisão podem ser utilizados para reconhecimento de topologias e assinatura de famílias proteicas. (115)

Um dos principais focos de estudo do nosso grupo é entender as bases estruturais que determinam a especificidade na montagem de um filamento de septinas, isto é, quais interações são específicas para cada uma das diferentes interfaces (G e NC) que estão presentes num filamento corretamente montado. Em vista da ausência de uma estrutura de um heterocomplexo com o detalhamento suficiente para analisar esta especificidade, modelagem por homologia para as diferentes interfaces G de septinas, uma vez que o objetivo do trabalho é entender os determinantes estruturais da interface G entre SEPT5 e SEPT8, foram feitas em colaboração com a doutoranda Sabrina Matos de Oliveira da Silva. Interfaces G tanto canônicas quanto não canônicas (não baseadas nas regras de Kinoshita) foram estudadas. Uma vez que as interações não canônicas não obedecem às regras de Kinoshita, e não serem esperados fisiologicamente, representam um controle negativo no experimento.

De tal modo, foram alinhados os domínios GTPase das 13 septinas humanas com SEPT10 de *Schistosoma mansoni* (SmSEPT10, *template*) com o programa *Jalview 2.8.2* e utilizando o algoritmo de alinhamento do *ClustalW*. Este alinhamento foi refinado utilizando a sobreposição das estruturas cristalográficas disponíveis (2QNR, 3T5D, 3SOP e 4KV9). Para preservar os elementos de estrutura secundária nas septinas, os *gaps* presentes dentro das sequências de aminoácidos pertencentes a hélices α e folhas β foram removidos e transferidos para as sequências pertencentes a *loops* usando um ajuste manual. Uma vez feito o alinhamento, os resíduos totalmente característicos para cada grupo de septinas foram identificados. Um resíduo característico para um grupo é definido como sendo conservado em todas as septinas pertencentes ao grupo mas ausente das septinas

dos demais grupos. O raciocínio para identificar resíduos característicos para cada grupo nasce das regras de Kinoshita, porque é esperado que contatos importantes para a especificidade nas interfaces sejam conversados entre os membros dos grupos. Desta forma, uma septina qualquer possa ser substituída por outra do mesmo grupo sem perder o contato na interface.

SEPT2, SEPT6, SEPT7 e SEPT9 foram escolhidas como septinas representantes para cada um dos grupos (grupos III, II, IV e I respectivamente) levando a 10 possíveis interfaces do tipo G. Assim, cinquenta modelos para cada uma das dez diferentes combinações (segundo a tabela 8) foram gerados usando o programa *Modeller 9.14*, utilizando como *template* *SmSEPT10-GTP (4KVA)* e *SmSEPT10-GDP (4KV9)*. SEPT2, SEPT7 e SEPT9 foram modeladas no complexo com *SmSEPT10* ligada a GDP (porque são cataliticamente ativas) e SEPT6 com *SmSEPT10* ligada a GTP (porque é cataliticamente inativa).

Tabela 8 - Combinações canônicas (✓) e não canônicas (X) de septinas.

	SEPT2	SEPT6	SEPT7	SEPT9
	Grupo III	Grupo II	Grupo IV	Grupo I
SEPT2	X	✓	X	X
SEPT6		X	X	X
SEPT7			?	✓
SEPT9				X

Fonte: Elaborada pelo autor.

A otimização dos modelos foi feita com um *Variable Target Function Method (VTFM)* seguida de um *simulated annealing*. Para incluir todas as restrições de distância tanto para a cadeia principal quanto para as cadeias laterais, valores padrões foram utilizados. O resultado da modelagem foi avaliado em termos da pseudo energia usando as opções *DOPE* e *GA341* do *MODELLER*. A estereoquímica foi avaliada com *Procheck*, o ambiente dos resíduos com *Verify-3D* e os contatos atômicos com *What_check*. Finalmente os resíduos característicos

foram mapeados nas estruturas geradas sendo visualizados com *PyMol*. O programa *LigPlot+* foi usado para identificar os contatos presentes na interface G dos complexos.

3.10 Análise de mutantes do complexo SEPT5-SEPT8 NGC

Com a finalidade de avaliar os resultados obtidos nos estudos de bioinformática (modelagem por homologia) e estudar a importância dos resíduos Phe131 em SEPT5 e Thr19 em SEPT8, para a especificidade entre septinas do grupo II e III, mutações nestes aminoácidos no complexo SEPT5-SEPT8(NGC) foram feitas.

Mutações sítio-dirigidas em Phe131 de SEPT5 e Thr19 de SEPT8 foram feitas pela aluna de mestrado Paola Lanzoni utilizando o método descrito por Fisher e Pie em 1997. (116) Os aminoácidos candidatos para substituir a Phe131 e Thr19 foram identificados no alinhamento da figura 37, onde Phe131 foi mutado por Thr que ocupa a mesma posição (conservado em todos os outros grupos) e Thr19 foi mutada por Ser (de igual forma conservada para as outras septinas).

Os oligonucleotídeos utilizados para realizar as mutações foram desenhados usando a ferramenta online *QuickChange Primer Design* (www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram), eles estão descritos na tabela 9.

Tabela 9 - Oligonucleotídeos para mutagêneses sítio dirigida

Nome do primer	Sequência
SEPT8NGC(T19S)-F	5'-CCTCTGTGTGGGGGAGAGCGGCATTGG-3'
SEPT8NGC(T19S)-R	5'-CCAATGCCGCTCTCCCCACACAGAGG-3'
SEPT5NGC(F131T)-F	5'-ACTTCATCTCCCCACCGGGCATGGGCTGC-3'
SEPT5NGC(F131T)-R	5'-GCAGCCCATGCCCGGTGGGGGAGATGAAGT-3'

Fonte: Elaborada pelo autor.

A reação em cadeia da polimerase foi realizada segundo as especificações do kit *QuickChange Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene). Após a reação em cadeia da polimerase, o produto de PCR foi submetido a digestão com a enzima *DnnI* (*ThermoFisher Scientific*) para eliminação do DNA molde sem a mutação desejada.

Células competentes de *E. coli* foram transformadas com o produto da digestão e depois de 16 hrs de incubação, colônias isoladas foram selecionadas para confirmação das mutações por sequenciamento de nucleotídeos.

Confirmadas as mutações, foram obtidos os complexos: SEPT5F131T-SEPT8, SEPT5-SEPT8T19S e SEPT5F131T-SEPT8T19S. A co-expressão e co-purificação dos complexos foram feitas como descritas nos itens 3.3 e 3.4.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Clonagem de SEPT5 e SEPT8 em vetores de expressão bicistrônicos

A sequência codificadora de SEPT8(NGC) foi amplificada pela reação em cadeia da polimerase a partir de uma biblioteca de ADNc de cérebro fetal humano (a sequência codificadora de SEPT5(NGC) foi clonada previamente no vetor de expressão pRSF-Duet e gentilmente cedido pela Dr. Joci N. Macedo). O produto da reação de 1290 pb (Figura 19A) foi purificado e inserido no plasmídeo pGEM-T *Easy* e a fidelidade da sequência foi confirmada por sequenciamento. Posteriormente, o fragmento de SEPT8(NGC) foi subclonado no plasmídeo de expressão em bactéria pRSF-Duet, que continha a SEPT5(NGC) clonada no *MCS-II*. Para confirmar a inserção de SEPT8(NGC) reação em cadeia da polimerase a partir de colônias foi realizada com sucesso como demonstrado na Figura 19B.

O clone pRSF-SEPT8(NGC)-SEPT5(NGC) foi utilizado como molde para amplificar os domínios GTPase de SEPT8 (831 pb) e SEPT5 (852 pb) (Figura 19C). Amplificados os domínios GTPase, foram inseridos no plasmídeo pGEM-T *Easy* e após confirmar a fidelidade das sequencias foram clonados no plasmídeo de expressão pET-Duet, sendo que SEPT5(G) foi inserida no *MCS-II* e SEPT8(G) no *MCS-I*. Finalmente a inserção dos genes foi confirmada pela reação em cadeia da polimerase a partir de colônias (Figura 19D).

Figura 19 – Análise de amplificação dos genes *SEPT5* e *SEPT8* (e suas versões truncadas). A) Produto da PCR de *SEPT8*(NGC), observando um tamanho estimado de 1290 pb. B) PCR de colônias de *SEPT8*(NGC) confirmando a inserção do transcrito no *MCS-I* de pRSF-Duet. C) Amplificação dos domínios GTPase de *SEPT5* (1) e *SEPT8* (2). Em D e E, PCR de colônias confirmando a inserção dos transcritos *SEPT5(G)* em *MCS-II* e *SEPT8(G)* em *MCS-I*, respectivamente.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Expressão, purificação e identificação dos complexos SEPT5-SEPT8

Nossa pesquisa iniciou com o estudo do complexo formado por SEPT5(NGC) e SEPT8(NGC). Clonadas as sequências codificadoras, o complexo foi co-expresso com sucesso de forma solúvel e co-purificado por uma combinação de cromatografia de afinidade a cobalto e cromatografia de exclusão molecular. Nestas etapas foram testadas diferentes condições de expressão (variando a linhagem de bactéria de expressão, concentração do agente indutor e temperatura de expressão) e diferentes tampões de purificação (listados na tabela 10).

Tabela 10 - Tampões para purificação

Tampão	Componentes do tampão
1. Tampão fosfato	100 mM Fosfato de sódio, 500 mM NaCl, 5mM MgCl ₂ , 5 mM β-Mercaptoetanol, 8% glicerol, pH 7,8
2. Tampão tris	25 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 5% glicerol, pH 7,8
3. Tampão tris_2	25 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 5mM β-Mercaptoetanol, 10% glicerol, pH 7,8
4. Tampão HEPES	20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 5mM β-Mercaptoetanol, 10% glicerol, pH 7,8

Fonte: Elaborada pelo autor.

Observamos inicialmente que a expressão feita a 28 °C permitia a co-expressão de grandes quantidades do complexo, mas na forma de agregados proteicos. Com isto, testes a 20°C foram realizados obtendo resultados similares (agregados proteicos quando tratando as proteínas no tampão 1). Mantendo a temperatura de 20°C, mas variando as condições do tampão 1 (acrescentando GTP, GDP ou uma mistura dos dois), continuamos observando só agregados proteicos durante a purificação por cromatografia de exclusão molecular (resultados não mostrados). Assim testes com os tampões 3 e 4 foram feitos. Quando estes tampões são utilizados em todas as etapas (lise bacteriana até purificação por exclusão molecular) agregados proteicos são obtidos, mas quando utilizamos o tampão 3 durante a lise e purificação por afinidade e trocamos para o tampão 4 durante a purificação de exclusão molecular, podemos separar moléculas com três estados oligoméricos diferentes. Mesmo assim a quantidade de agregado proteico continuava sendo considerável, a razão pelo qual foi testada a seguinte estratégia: eluímos pequenas quantidades (2 mL) do complexo da cromatografia de afinidade (evitando concentrar por centrifugação, como foi feita nas abordagens anteriores) e

injetamos diretamente na coluna para cromatografia de exclusão molecular. Com esta última estratégia foi possível obter três picos durante a cromatografia de exclusão molecular com uma resolução e quantidade razoável.

A figura 20 mostra estes resultados obtidos nas melhores condições de expressão e purificação (como descritas na seção 3.3 e 3.4). Na figura podemos observar, em A, que os componentes do complexo SEPT5-SEPT8(NGC) eluem de uma forma quase equimolar durante a cromatografia de afinidade ao cobalto. Este resultado também mostra, já que só SETP8(NGC) apresenta cauda de histidina, uma grande afinidade entre as proteínas como observadas nos ensaios de duplo híbrido por Blaser (2002) e Martinez (2004). (85,87) Quando o complexo é purificado por cromatografia de exclusão molecular (Superdex 200 10/300 GL) é possível observar três picos principais: o primeiro pico pertence ao agregado proteico, um segundo pico estimado para uma molécula com 290 KDa e um último pico com uma massa molar de 64 KDa (Figura 20B). A eletroforese usando gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) 10% revela que tanto no pico I quanto no pico II o complexo SEPT5-SEPT8(NGC) está presente de forma aparentemente equimolar e que o pico III representa a SEPT8(NGC) eluindo sozinha. Isto pode ser devido ao fato dela apresentar a cauda de histidina permitindo que ligue em maiores quantidades na resina durante a purificação por afinidade (Figura 20C).

Figura 20 – Expressão e Purificação do complexo SEPT5-SEPT8(NGC). A) SDS-PAGE 10% das alíquotas coletadas durante a purificação por afinidade. SEPT8(NGC) e SEPT5(NGC) são identificadas nas eluições. P: fração insolúvel, S: fração solúvel, NL: proteínas que não interagem com o cobalto imobilizado na resina, L1 e L2: lavagens, E1 e E2, eluições com 250 de imidazol; E3 eluição com 500 mM de imidazol. M: marcador de massa molecular. B) Cromatograma da purificação por exclusão molecular (Superdex 200 10/300 GL) do complexo SEPT5-SEPT8(NGC). C) SDS-PAGE 10% das alíquotas coletadas da purificação por exclusão molecular. Nos picos I e II é possível observar a eluição de ambas proteínas, no entanto, no pico II somente SEPT8(NGC).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma purificação onde os picos estão resolvidos, com a obtenção de uma amostra equimolar e com um estado oligomérico razoável, era um resultado inicial bastante promissor para começar os estudos estruturais e biofísicos. Porém, quando o pico II é analisado com técnicas mais sensíveis para achar as espécies presentes em solução, os resultados mostraram uma amostra heterogenia (isto será detalhado na seção 4.3.1). Como alternativa a este problema, foi proposta a construção do complexo SEPT5-SEPT8 contendo só os domínios GTPase pois nosso foco de interesse está na especificidade de interação da interface G entre SEPT5 e SEPT8.

O complexo SEPT5-SEPT8(G) foi co-expresso e co-purificado nas mesmas condições que o complexo contendo os três domínios. Podemos observar que o

complexo SEPT5-SEPT8(G) foi co-purificado de forma equimolar durante a cromatografia por afinidade a cobalto (Figura 21A). Este resultado sugere, como esperado, que a interface de interação entre as duas proteínas está mediada pelos domínios G (formando interface G) porque mesmo removendo o N e C-terminal elas continuam eluindo juntas, sendo que só SEPT8(G) apresenta a cauda de histidina no seu extremo N-terminal. Estes resultados confirmam o observado por Martínez (2004). (87) A cromatografia de exclusão molecular (HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade) mostra novamente três picos: o pico I que representa o agregado proteico (diminuído claramente em comparação com o caso dos três domínios), um segundo pico com uma massa molecular estimada para uma molécula de 81 KDa e finalmente um último pico com uma massa molar para uma molécula de 36 KDa (Figura 21B). A SDS-PAGE 10% revela que as frações que correspondem o pico II apresentam o complexo SEPT5-SEPT8(G) equimolar e que o pico III pertence a SEPT8(G) eluindo em excesso da mesma forma como o complexo com os domínios inteiros (Figura 21C).

Figura 21 - Expressão e Purificação do complexo SEPT5-SEPT8(G). A) SDS-PAGE 10% das alíquotas coletadas durante a purificação por afinidade. SEPT8(G) e SEPT5(G) são identificadas como co-purificadas nas eluições. P: fração insolúvel, S: fração solúvel, NL: proteínas que não interagem com o cobalto imobilizado na resina, L1 e L2: lavagens, E1 e E2 eluições com 250 de imidazol; E3 eluição com 500 mM de imidazol. M: marcador de massa molecular. B) Cromatograma da purificação por exclusão molecular (HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade) do complexo SEPT5-SEPT8(G). C) SDS-PAGE 10% das alíquotas coletadas da purificação por exclusão molecular. Nos picos I e II é possível observar a eluição de ambas proteínas, no entanto, no pico II somente SEPT8(G).

As bandas presentes nos géis (identificadas inicialmente conforme as massas moleculares teóricas), após a cromatografia de exclusão molecular, foram cortadas e tratadas com tripsina para a identificação das proteínas por espectrometria de massa. Assim foram identificadas SEPT5 e SEPT8 tanto no complexo NGC quanto no complexo com os domínios G (Figura 22).

Figura 22 - Espectrometria de massa dos complexos SEPT5-SEPT8(NGC) e SEPT5-SEPT8(G). Em A e B é mostrado o *output* da análise, usando o *Mascot Research*, identificando a SEPT8 e SEPT5 com todos seus domínios, respectivamente. Em C e D, o resultado para SEPT8(G) e SEPT5(G). Em vermelho estão ressaltados os peptídeos identificados. *Nas figuras 20 e 21, as bandas são indicadas no gel conforme os resultados de espectrometria de massas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para conhecer o comportamento das proteínas individuais, expressamos e purificamos tanto SEPT5(G) quanto SEPT8(G) sozinhas (nas condições descritas no item 3.3 e 3.4). Quando as proteínas são tratadas nas mesmas condições do complexo SEPT5-SEPT8(G), podemos observar que elas ficam totalmente na fração insolúvel (Figura 23A e C). Alterando as condições do tampão (tabela 10), principalmente a concentração de sal (NaCl) e porcentagem de glicerol, notamos que as duas proteínas apresentam um grau de solubilidade maior comparado com as condições iniciais. Além disto notamos que SEPT8(G) fica muito mais solúvel comparando com SEPT5(G) e apresenta menor quantidades de contaminantes quando é eluída da coluna cromatográfica de afinidade (Figura 23B e D). Estes resultados tomados em conjunto, são um indicativo de que SEPT5(G) e SEPT8(G) são mais solúveis quando estão formando um heterocomplexo dimérico do que

quando estão isoladas. Este aumento na estabilidade em forma de complexo parece coerente com o fato delas co-localizarem quando são expressas em células de mamíferos, indicando que a complexação de SEPT5 e SEPT8 é fisiologicamente relevante. (87)

Figura 23 - Expressão e purificação de septinas individuais. A) SDS-PAGE 10% de SEPT8(G) mostrando que é totalmente insolúvel quando é tratada nas mesmas condições do complexo. B) SDS-PAGE 10% mostrando parte da SEPT8(G) solúvel, quando as condições do tampão foram mudadas para 25 mM HEPES, 800 mM de NaCl e 12% glicerol. C) SDS-PAGE 10% de SEPT5(G) mostrando que é insolúvel quando é tratada nas mesmas condições do complexo. D) SDS-PAGE 10% mostrando que parte da SEPT5(G) é solúvel quando mudadas as condições do tampão para 20 mM NaCl e 20% de glicerol. P: fração insolúvel, S: fração solúvel, NL: proteínas que não interagem com o cobalto imobilizado na resina, L1 e L2: lavagens, E1 e E2 eluições com 250 de imidazol; E3 eluição com 500 mM de imidazol. M: marcador de massa molecular.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As massas moleculares descritas anteriormente para cada um dos picos dos cromatogramas das purificações, foram estimadas baseadas na curva de calibração da coluna cromatográfica, com proteínas globulares padrões (Figura 24). Tanto o complexo SEPT5-SEPT8(NGC) quanto o complexo SEPT5-SEPT8(G) foram purificados numa coluna HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade para determinar seus estados oligoméricos usando a curva de calibração. Assim, utilizando os dados

de eluição e massa molecular dos padrões foi possível obter a seguinte equação da reta:

$$y = 2,00483 - 0,33473x \quad (24)$$

onde y é o K_{av} da proteína e x o logaritmo da massa molecular. Esta equação permite estimar a massa molecular de cada um dos picos observados durante a purificação e com isto, estimar seu estado oligomérico.

Figura 24 - Curva de calibração da coluna cromatográfica HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para os picos observados na purificação do complexo SEPT5-SEPT8(NGC), o pico II apresenta uma massa molecular estimada de 290 KDa e o pico III uma massa de 64 KDa. A massa molecular teórica de um dímero SEPT5-SEPT8(NGC) é de 94 KDa, pelo que o pico II poderia representar um estado oligomérico que corresponderia a pelo menos um tetrâmero uma vez que este teria uma massa molecular teórica de 188 KDa. A proposta de um tetrâmero é devido ao fato da forma alongada de um complexo tetramérico, razão pela qual a massa molecular

pode ser superestimada. O raio hidrodinâmico de um complexo tetramérico (cuas dimensões aproximadas seriam da ordem de 50x50x200Å, baseado na estrutura cristalográfica do complexo da SEPT2, SEPT6 e SEPT7) (76) será maior do que esperado para uma molécula esférica da mesma massa molecular, portanto, existe uma superestimação da massa molecular do complexo quando analisado por SEC (Figura 25). Embora a massa molecular calculada por SEC seja mais parecida com um hexâmero (massa teórica de 282 KDa), a proposta de um tetrâmero ainda continua plausível. Primeiro, porque um hexâmero sofreria da mesma superestimação da massa molecular que o tetrâmero, uma vez que é uma molécula mais alongada (sua massa molecular aparente iria além dos 293 KDa calculados na SEC). Segundo, porque em um filamento fisiológico é esperado observar uma interface G entre SEPT5 e SEPT8 e uma interface NC entre duas SEPT5 (Figura 25). Portanto, para formar um hexâmero usando SEPT5 e SEPT8, seria necessária uma interface NC do tipo promiscua entre duas SEPT8, indo contra de um filamento fisiológico. Assim, o estado oligomérico de maior ordem possível utilizando apenas interfaces consideradas fisiológicas (interfaces canônicas) seria um tetrâmero.

Figura 25 - Aproximação das dimensões de um complexo tetramérico formado por SEPT5 e SEPT8.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O pico III, como mostrado na SDS-PAGE 10% é SEPT8(NGC) eluindo sozinha, representaria um monômero de SEPT8 uma vez que sua massa teórica é de 51 KDa. Da mesma forma que acontece com o complexo tetramérico, a massa de SEPT8(NGC) provavelmente é superestimada pela presença dos domínios N e C-

terminal (o que faz com que não tenha uma forma esférica), uma vez que SEPT8 pertence ao grupo com o maior C-terminal dentro de todas as septinas.

Na estimativa da massa molecular dos picos observados para SEPT5-SEPT8(G), o pico II apresenta uma massa aproximada de 81 KDa e o pico III uma massa molecular de aproximadamente 36 KDa. Em teoria, a massa molecular de um dímero de SEPT5-SEPT8(G) é de 68 KDa sugerindo que este é o estado oligomérico mais provável para o pico II usando o mesmo raciocínio elaborado acima. O pico III, identificado como SEPT8(G) na SDS-PAGE10%, representaria um monômero de SEPT8 uma vez que sua massa teórica é de 33KDa. Vale a pena ressaltar que a estimativa da massa molecular do monômero de SEPT8(G) é mais próximo do teórico pelo fato de ser mais aproximada a uma esfera, uma vez que os domínios N e C-terminal estão ausentes.

4.3 Caracterização biofísica

4.3.1 Estado de homogeneidade e de agregação dos complexos SEPT5-SEPT8(NGC) e SEPT5-SEPT8(G)

Com o intuito de avaliar o estado de homogeneidade das amostras, espalhamento dinâmico de luz e ultracentrifugação analítica foram feitos para amostras do complexo SEPT5-SEPT8(NGC) e SEPT5-SEPT8(G).

Inicialmente, como já descrito, o trabalho foi desenvolvido co-expressando e co-purificando o complexo SEPT5-SEPT8(NGC). Após a cromatografia de exclusão molecular, uma amostra do pico II (figura 20B) foi analisada com espalhamento dinâmico de luz. O resultado da tabela 11, mostra que foi detectado um pico com um raio hidrodinâmico compatível com uma proteína de 293 KDa e com uma porcentagem de polidispersidade (%Pd) de 23,9%. Também foi observado um pico, não significativo em porcentagem de massa, de agregado proteico polidisperso e um pico de aproximadamente 200 Da pertencente aos componentes do tampão (Figura 26). Este resultado é característico de amostras heterogêneas ou polidispersas (mais de uma espécie em solução). Mesmo assim, observa-se uma população que corresponde ao complexo com uma massa estimada de 293 KDa, compatível com

os resultados obtidos por cromatografia de exclusão molecular (290 KDa), sugerindo a existência do complexo na forma tetramérica uma vez que o DLS sofre o mesmo defeito que a SEC superestimando a massa molecular de moléculas não esféricas.

Tabela 11 - Distribuição de resultados do DLS para o complexo SEPT5 SEPT8(NGC)

Proteína (1mg/mL)	Raio hidrodinâmico (nm)	%Pd	Massa molecular estimada (KDa)
SEPT5-SEPT8(NGC)	13,5 ± 3,4	23,9	293,6

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 26 - Gráfico do DLS mostrando as espécies em solução detectadas pela intensidade de luz espalhada. O primeiro pico (0,5 nm aproximadamente) pertence as moléculas presentes no tampão. O pico 2 (13 nm aproximadamente) pertence ao complexo tetramérico formado por SEPT5 e SEPT8 e o ultimo pico é de agregados proteicos de alta massa molecular. As cores representam as três medidas (triplicata) feitas durante o experimento.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para confirmar os resultados obtidos no DLS, as mesmas amostras pertencentes ao pico II foram submetidas a ultracentrifugação analítica. A tabela 12, mostra os resultados obtidos de coeficiente de sedimentação observados para o complexo SEPT5-SEPT8(NGC) e o valor do coeficiente friccional estimado a partir

de ajustes nos coeficientes de sedimentação pela equação de Lamm no programa *Sedfit*.

Tabela 12 - Resultados da ultracentrifugação analítica para o complexo SEPT5-SEPT8(NGC)

Concentração da proteína	Coeficiente friccional (f/f_0)	Coeficiente de sedimentação (s _{20,W})	Massa Molecular estimada (KDa)
7,3 μ M	1,7363	4,148 S	92 KDa
		7,193 S	210 KDa

Fonte: Elaborada pelo autor.

Podemos observar então dois coeficientes de sedimentação, um em torno de 4,148 S, que é um valor compatível com um dímero (coeficiente de sedimentação teórico de 4,23 S) e outro com valor de 7,193 S, compatível como um tetrâmero como mostrado na figura 25 (coeficiente de sedimentação teórico de um tetrâmero é 6,60 S, enquanto de um hexâmero é 8,74 S). Assim, podemos confirmar a presença de duas espécies em solução, caracterizando uma amostra heterogenia.

O fator de Perrin (f/f_0) permite avaliar quão assimétrica é uma proteína, utilizando seu coeficiente friccional. O coeficiente friccional (f) é dependente tanto da massa molecular quanto da forma da proteína. Para uma proteína de uma massa específica, o seu valor de f pode ser incrementado (influenciado) pela sua forma e assimetria, seja elipsoidal ou alongada. O f_0 , é definido como o coeficiente friccional para uma proteína esférica da mesma massa. O valor real de f para uma proteína, será sempre maior que seu f_0 , isto porque uma proteína nunca é perfeitamente esférica. Além disto, o fator de Perrin superestima a assimetria das proteínas uma vez que as trata como se fossem elipsoides lisos, esquecendo que apresentam uma superfície rugosa. (117-118) Existem valores em média para definir quanto globular ou alongada é uma proteína em função do seu coeficiente friccional, assim temos: proteínas globulares apresentem um coeficiente friccional de entre 1,2 e 1,3;

proteínas moderadamente alongadas valores entre 1,5 e 1,9; e finalmente proteínas alongadas valores de entre 2,0 até 3,0. Baseado nestas informações podemos observar que o coeficiente friccional (f/f_0) do complexo SEPT5-SEPT8(NGC) está dentro dos valores de proteínas moderadamente alongadas, o que pode ser um motivo da superestimação da massa molecular observada tanto em SEC quanto no DLS e afiançando a proposta de um complexo tetramérico.

Pela experiência do grupo trabalhando com septinas, é sabido que complexos formados por septinas que apresentam os três domínios não são estáveis em termos de manter um único estado oligomérico em solução e pela sua tendência de formar agregados proteicos. Com estas observações, uma vez que amostras heterogêneas não podem ser empregadas para realizar estudos biofísicos e estruturais, a construção do complexo SEPT5 e SEPT8 contendo só os domínios GTPase das suas septinas foi realizado.

Os resultados do DLS para o complexo SEPT5-SEPT8(G) mostram um pico com um raio hidrodinâmico compatível com uma proteína de 99 KDa e uma porcentagem de polidispersidade de 16.5% (Tabela 13). Ainda foram observados tanto o pico dos componentes do tampão quanto o pico do agregado proteico (Figura 27). Embora a massa estimada de 99 KDa seria compatível com um trímero, uma proposta alternativa, compatível com os argumentos já apresentados, seria um dímero (de massa teórica 68 KDa) com formato alongado.

Tabela 13 - Distribuição de resultados do DLS para o complexo SEPT5-SEPT8(G)

Proteína (1mg/mL)	Raio hidrodinâmico (nm)	%Pd	Massa Molecular estimada (KDa)
SEPT5-SEPT8(G)	8,9 ± 1,5	16,5	99 KDa

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 27 - Gráfico do DLS mostrando as espécies em solução detectadas pela intensidade de luz espalhada. O primeiro pico (0,5 nm aproximadamente) pertence as moléculas presentes no tampão e que espalham a luz. O pico 2 (8,9 nm aproximadamente) pertence ao complexo dimérico formado por SEPT5 e SEPT8 e o ultimo pico é de agregados proteicos de alta massa molecular. As cores representam as três medidas (triplicata) feitas durante o experimento.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Da mesma forma que com o complexo SEPT5-SEPT8(NGC), análise de ultracentrifugação analítica foi feita para o complexo SETP5-SEPT8(G). Foi observado um único pico com um coeficiente de sedimentação de 3,66 S, o que corresponde a um dímero de SEPT5-SEPT8(G) uma vez que o coeficiente de sedimentação teórico para: um monômero é 2,18 S, um dímero 3,34 S, um trímero 4,41 S e para um tetrâmero é igual a 5,38 S (tabela 14). O coeficiente friccional do complexo SEPT5-SEPT8(G) sugere que é uma proteína moderadamente alongada, como visto com o complexo (NGC), o que pode estar relacionado da mesma forma a superestimação da massa molecular na SEC e no DLS. Este resultado, portanto, mostra que a espécie predominante em solução é o complexo dimérico SEPT5-SEPT8(G) e monodisperso (como observado no DLS), o qual permite realizar os ensaios biofísicos e estruturais com este complexo.

Tabela 14 - Resultados da ultracentrifugação analítica para o complexo SEPT5-SEPT8(G)

Concentração da proteína	Coeficiente friccional (f/f₀)	Coeficiente de sedimentação (s_{20,W})	Massa Molecular estimada (KDa)
10,0 µM	1,46865	3,669 S	60 KDa

Fonte: Elaborada pelo autor.

As septinas apresentam uma grande tendência a formar complexos oligoméricos de alto peso molecular com o aumento da sua concentração em solução. Em vista disto, medidas de DLS em diferentes concentrações foram feitas para estudar o efeito da concentração no estado oligomérico do complexo SEPT5-SEPT8(G). A tabela 15 resume os resultados obtidos. A escolha do complexo contendo só os domínios GTPase é justificada pelo fato de ser o complexo selecionado para continuar com os estudos biofísicos e estruturais, assim também pela sua tendência a ser melhor comportado comparado como o complexo “NGC” e à sua monodispersidade em solução.

Tabela 15 - Medidas de DLS a diferentes concentrações do complexo SEPT5-SEPT8(G). Os resultados se referem ao pico previsto para um dímero observado na figura 27.

Concentração da proteína (mg/mL)	Raio hidrodinâmico (nm)	%Pd
0,4	8,5 ± 2,0	22,1
0,6	8,9 ± 2,4	26,8
0,8	8,5 ± 2,4	26,5
1,0	8,5 ± 1,6	17,9
1,2	8,5 ± 1,7	18,9
2,2	8,5 ± 1,6	18,2
3,0	8,1 ± 1,3	15,2

Fonte: Elaborada pelo autor.

Podemos observar que em todas as medidas a diferentes concentrações obtemos uma molécula com um raio hidrodinâmico em média de $8,5 \pm 1,9$ nm, similar à primeira medida do DLS de SEPT5-SEPT8(G) a 1 mg/mL (com uma massa estimada para uma molécula de 99 KDa, o que seria um heterodímero). Podemos observar também duas tendências relacionadas ao aumento da concentração da proteína: a primeira é que o aumento da concentração da proteína não muda o estado oligomérico do complexo (observando dímeros em solução) e a segunda é que o grau de monodispersidade aumenta. Outra observação a ressaltar é que, além do aumento no grau de monodispersidade do dímero (em função do aumento da concentração), o mesmo fenômeno é visto em relação as espécies detectadas como agregados proteicos. Em vista disto, consideramos que os agregados monodispersos não interfeririam negativamente durante o processo de cristalização. Diversos estudos de DLS com proteínas modelo, demonstraram que amostras com precipitantes causam agregados antes de atingir a supersaturação e não tendo sucesso na cristalização, por outro lado amostras que apresentam precipitados, mas se mantendo como monodispersas podem atingir o ponto de nucleação e com isto a cristalização. (108)

A figura 28 mostra a medida de DLS do complexo SEPT5-SEPT8(G) a 3,0 mg/mL. Podemos observar uma única espécie em solução com um raio hidrodinâmico aproximadamente de 9 nm (Figura 28A). O correlograma mostra que foi detectada uma única espécie em solução, uma vez que as curvas das três medidas feitas no experimento, caem perfeitamente uma acima da outra (Figura 28B). Estes resultados mostram uma maior estabilidade do complexo relacionado ao aumento da concentração. Isto foi utilizado para guiar as tentativas de cristalização do complexo SEPT5-SEPT8(G) (seção 4.4).

Figura 28 – Resultados de DLS obtidos para o complexo SEPT5-SEPT8(G) a 3mg/mL. Em A o gráfico mostra o tamanho das espécies observadas pelo número de espécies detectadas. Podemos observar que única espécie detectada em solução apresenta um raio hidrodinâmico previsto para um dímero do complexo. Em B o correlograma indica que durante as três medidas foi detectada uma única espécie em solução.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.2 Conteúdo de nucleotídeos do complexo SEPT5-SEPT8(G) e SEPT8(G)

Septinas são proteínas com a capacidade de ligar e hidrolisar o GTP. Embora não seja esclarecido, diversas evidências sugerem que a ligação e hidrólise sejam relacionadas com a formação de filamentos e, portanto, com a função biológica. (47,51,72,119) Para determinar se há nucleotídeo ligado ao complexo SEPT5-SEPT8(G) co-expresso, e subsequentemente co-purificado, empregou-se o método descrito por Seckler e colaboradores no qual a proteína é desnaturada com ácido perclórico e a liberação do nucleotídeo é analisado por cromatografia líquida de alta pressão em uma coluna de troca iônica. (97)

O cromatograma da figura 29 mostra que o complexo SEPT5-SEPT8(G) libera tanto GDP quanto GTP (em uma proporção de aproximadamente 1:1). Este resultado é esperado uma vez que se espera comportamentos semelhantes entre septinas do mesmo grupo e no heterocomplexo SEPT2-SEPT6-SEPT7, encontra-se SEPT2 (do mesmo grupo que SEPT5) ligada a GDP enquanto SEPT6 (do mesmo grupo que SEPT8) está ligada a GTP. (76) Além disso, um estudo onde SEPT2-SEPT6(G) foram co-expressas e co-purificadas como complexo dimérico, mostrou que GTP e GDP estão ligados no complexo com 70% GDP e 30% GTP. (73) Portanto, como observado para SEPT2 e SEPT6, esperamos que SEPT5 estaria

ligada a GDP e SEPT8 a GTP. A ideia de que SEPT8 estaria ligada ao GTP é sustentada em sua incapacidade de hidrolisar o GTP (120) e reforçado com o observado na estrutura cristalográfica para SEPT6, septina do mesmo grupo.

Figura 29 - Cromatograma do HPLC mostrando a presença de nucleotídeos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

SEPT8(G) monomérica foi também desnaturada e analisada por cromatografia líquida de alta pressão para avaliar o conteúdo de nucleotídeo. No cromatograma é mostrado que SEPT8(G) não apresentou nucleotídeos ligados, ou seja, ela se encontra na sua forma apo (Figura 29). Isto já foi observado (120), onde SEPT8(G) além de estar presente na sua forma apo apresenta uma capacidade catalítica mínima (o que pode ser catalogado como sem capacidade de hidrolisar GTP). (120) A mesma característica foi observada para SEPT6(G) e SEPT11(G), purificadas como proteínas monoméricas e sem nucleotídeo ligado. (73,121)

Estes resultados sugerem a importância da presença do nucleotídeo na formação e estabilização do complexo SEPT5-SEPT8(G), e é coerente com dados do complexo SEPT2-SEPT6(G) que quando é incubado com fosfatase alcalina (enzima que remove grupos fosfatos) se dissocia completamente. (73) A

estabilização da interface G pela presença de nucleotídeo não é observada unicamente para heterocomplexos, também podemos observar este atributo para SEPT2 e SEPT7 individualmente (uma vez que mutações em aminoácidos envolvidos na formação da interface G mostra desestabilização de homodímeros), reforçando a ideia de que a presença do nucleotídeo é importante para a formação e estabilização dos complexos. (53,56,76)

Baseado nestes resultados, e as observações relatadas para SEPT6 e SEPT11, podemos concluir que septinas do grupo II estão presentes na forma monomérica quando expressas individualmente e não apresentam nucleotídeo ligado. São capazes de ligar GTP apenas na presença do seu parceiro do grupo III, por exemplo SEPT2 ou SEPT5. Finalmente são cataliticamente inativas. Todas estas características comuns dentro dos integrantes do grupo II talvez estejam relacionadas às regras de Kinoshita e consequentemente reforçando-as, uma vez que em um filamento fisiológico uma septina pode ser substituída unicamente por outra do mesmo grupo. Portanto, estas características serão relevantes para definir a posição de septinas do grupo II dentro do filamento? Vamos tentar responder esta pergunta analisando os resultados obtidos mais adiante.

Aproveitando que SEPT8(G) está na sua forma apo e monomérica, e com o conhecimento de que quando septinas individuais são incubadas com nucleotídeo tendem a formar filamentos ou, no caso de septinas só com o domínio GTPase, complexos diméricos (72,77), o mesmo foi incubada com GDP e GTP para avaliar a formação de complexos oligoméricos de maior tamanho. Como mostrado na figura 30, SEPT8(G) monomérica na forma apo elui aproximadamente no volume 17,5 mL quando injetada em uma coluna cromatográfica Superdex 200 10/300 GL. Após a incubação *overnight* com excesso de nucleotídeo, o seu estado oligomérico não é alterando e, portanto, continua saindo no mesmo volume (17,5 mL). Assim, temos duas possibilidades: a presença do nucleotídeo não altera o estado oligomérico de SEPT8(G) ou simplesmente ela não ligou GTP nem GDP. Partindo disso, decidimos avaliar (utilizando métodos quantitativos) sua afinidade pelo GTP e GDP, como descrito na seguinte seção.

Figura 30 - Cromatograma mostrando que SEPT8(G) não muda seu estado oligomérico quando é incubada com nucleotídeos. O pico eluindo aproximadamente em 22,5 mL pertence ao excesso de nucleotídeo. Coluna cromatográfica utilizada: Superdex 200 10/300 GL.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.3 Ligação de GTP e GDP em SEPT8(G)

SEPT8(G), é uma septina que pertence ao grupo II que tem como característica relevante a incapacidade de hidrolisar GTP para GDP (são cataliticamente inativas). Como observado, SEPT8(G) não muda o seu estado oligomérico (monômero) para moléculas de maior tamanho quando é incubada com GTP ou GDP. Assim, análises para avaliar a ligação de nucleotídeos foram realizados utilizando termoforese em microescala (MST).

As figuras 31 e 32 mostram os resultados da MST para medidas de afinidade entre SEPT8(G) e GTP ou GDP. Podemos observar em ambos os resultados que, durante os primeiros 5 s a fluorescência é detectada de forma constante o que mostra uma distribuição homogênea das espécies em solução, confirmado na imagem de *cap scanning* mostrado para cada ensaio (Figuras 31B e 32B). Uma vez acendido o *laser* infravermelho (no tempo $t=5$, linha azul), a termoforese das moléculas fluorescentes submetidas a excitação por 30 s mostra que para ambos experimentos não houve ligação entre as moléculas marcadas (SEPT8) e as não marcadas (GTP ou GDP), uma vez que não houve mudanças no movimento

termoforético delas (sem ganho na fluorescência como mostrado na tabela 16). Ou seja, o decaimento das 16 curvas ao longo dos 30 s após acionado o laser é efetivamente igual, sendo que se houvesse ligação entre elas a fluorescência experimentaria um decaimento mais lento em função da difusão, que é mais lenta para o complexo. Além disto, a fluorescência detectada sofreria um aumento proporcional à gradiente de concentração dos nucleotídeos. (101-102) Os resultados são interessantes porque mostram que mesmo em concentrações muito elevadas (9 mM para GTP e 6,25 mM para GDP), não é vista interação entre as moléculas confirmando a hipótese vista *in vitro*, que não existe interação mesmo em concentrações saturantes.

Figura 31 - Termoforese de SEPT8(G) frente ao GTP. A) Gráfico de gradiente termal mostrando que SEPT8(G) e o GTP não interagem, uma vez que não houve ganhos significativos na fluorescência detectada durante os 30 s de acendido o *laser*. A curva com maior fluorescência detectada pertence à maior concentração de GTP (9 mM), pelo que a sobressaturação poderia ter levado a este aumento. B) Fluorescência detectada para os 16 capilares no tempo $t=0$, observando que todos apresentam uma fluorescência relativamente similar e indicando uma distribuição homogênea das espécies em solução.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 16 - Fluorescência detectada no tempo $t=30$ para cada um dos nucleotídeos (concentrações em um gradiente)

SEPT8(G) vs GTP		SEPT8(G) vs GDP	
Concentração de GTP (μM)	Fnorm (1/1000)	Concentração de GDP (μM)	Fnorm (1/1000)
9000,0	844,36	6250,0	934,70
4500,0	834,47	3125,0	930,47
2250,0	828,55	1562,5	930,22
1125,0	826,66	781,3	930,49
562,5	827,67	390,6	930,49
281,3	828,17	195,3	931,88
140,6	826,48	97,7	929,84
70,3	826,26	48,8	930,95
35,2	827,58	24,4	931,22
17,6	827,57	12,2	931,77
8,8	826,05	6,1	930,68
4,4	828,26	3,0	930,79
2,2	827,35	1,5,	930,13
1,1	826,63	0,8	930,09
0,5	827,18	0,4	930,87
0,3	826,78	0,2	931,98

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como mostra a tabela 16, efetivamente não houve ganhos significativos na fluorescência detectada para ambos experimentos. Assim, podemos concluir que não houve ligação significativa entre SEPT8(G) e os nucleotídeos.

Figura 32 - Termoforese de SEPT8(G) frente ao GDP. A) Gráfico de gradiente termal mostrando que SEPT8(G) e o GDP não interagem, uma vez que não houve ganhos significativos na fluorescência detectada durante os 30 s de acendido o *laser*. B) Fluorescência detectada para os 16 capilares no tempo $t=0$, observando que todos apresentam uma fluorescência relativamente similar e indicando uma distribuição homogênea das espécies em solução

Fonte: Elaborada pelo autor.

A não ligação de nucleotídeo foi também observada para SEPT11(G) (purificada na forma monomérica), um membro do mesmo grupo que SEPT8. Após incubação com GTP ou GDP foi feita cromatografia líquida de alta pressão para avaliar a presença dos nucleotídeos liberados utilizando o método de desnaturação química (ácido perclórico) ou desnaturação térmica. (121) Já no caso de SEPT6(G), por enquanto, é confirmado que não há nucleotídeo ligado direto do sistema de expressão (73). A não ligação de nucleotídeos por parte dos domínios GTPase de SEPT8(G), SEPT11(G) e SEPT6(G), revela que o grupo não perdeu somente a capacidade de hidrolisar o nucleotídeo, mas também a capacidade de manter ele ligado quando na sua forma monomérica.

Assim, a incapacidade de SEPT8(G) de ligar nucleotídeo (seja GTP ou GDP) explica o porquê não forma complexos oligoméricos quando é incubada com um excesso deles. Então, uma questão que surge a partir destas observações é por que

SEPT8(G) encontra-se ligada a GTP quando forma um dímero com SEPT5(G)? Como é possível explicar este comportamento?

SEPT8 é uma septina pertencente ao grupo II que perdeu a capacidade de hidrolisar GTP, uma vez que septinas deste grupo não apresentam a treonina conservada no *Switch I* que confere esta capacidade. Além disto, estudos anteriores mostram que os motivos *Switch I* e *Switch II* são importantes para a ligação e estabilização dos nucleotídeos. (51,56) Analisando a sequência de aminoácidos das 13 septinas humanas em um alinhamento, podemos observar que septinas do grupo II apresentam uma deleção de 5 resíduos de aminoácidos no *Switch I* junto com a perda da treonina catalítica. Além disto um resíduo característico do grupo II encontra-se no motivo *Switch II*, onde uma valina ocupa o lugar de uma prolina conservada para todas os outros grupos (Figura 37). Com o intuito de analisar quanto afetaria a mudança de uma prolina por uma valina no *Switch II*, analisamos a estrutura cristalográfica de SEPT3 em complexo com um análogo de GTP. Pro127 da SEPT3 (código PDB: 4Z51) apresenta ângulos torcionais de $\phi = -60,5^\circ$ e $\psi = 133,8$ permitindo o carbonila da Thr126 a formar uma ligação de hidrogênio com uma molécula de água que coordena o Mg^{2+} que liga junto com o GTP. Os ângulos torcionais apresentados pela prolina são extremamente incomuns para uma valina devido a presença da bifurcação da sua cadeia lateral a partir do C_β (122). Espera-se, portanto, que a presença da valina em septinas do grupo II levaria a uma mudança conformacional do Switch II, incompatível com a coordenação da molécula de água, enfraquecendo a ligação do Mg^{2+} /GTP. Embora especulativamente, esta hipótese (a ser testada experimentalmente no futuro) representa a melhor explicação pela falta de afinidade entre nucleotídeos e septinas do grupo II apresentada até o momento.

Estas peculiaridades podem fazer com que septinas do grupo II, quando isoladas, permitam a entrada do nucleotídeo no sitio de ligação, uma vez que o motivo *P-loop* e G4 (*AKAD*) são conservados, mas não a sua estabilização como estado ligado. Para o caso do complexo SEPT5-SEPT8(G), a ligação e estabilização do GTP em SEPT8(G) pode ser explicado pelo fato de que a interface de interação entre as duas proteínas envolve os sítios de ligação dos nucleotídeos, segurando desta forma o GTP em SEPT8(G). Estas observações indicam que de fato os

nucleotídeos são importantes para a formação e estabilização do complexo, mas ao mesmo tempo que septinas do grupo II conseguem manter o GTP ligado só na presença do seu parceiro. Temos que ressaltar que este parceiro não pode ser outra cópia de SEPT8(G) uma vez que seu estado oligomérico não mudou na presença de GTP ou GDP, mostrando que é incapaz de formar homodímeros (esperado e compatível com a sua posição no filamento, Figuras 10 e 12). Portanto, o fenômeno de aumento de afinidade pelo GTP é dependente da presença de uma septina diferente, ou seja, do seu parceiro específico (SEPT5).

4.3.4 Enovelamento e estabilidade térmica do complexo SEPT5-SEPT8(G) e SEPT8(G)

Em vista de que SEPT8(G) não tem a capacidade de ligar nucleotídeos quando no estado monomérico, estudos de dicroísmo circular para avaliar seu estado de enovelamento foram feitos, já que existia a hipótese de que ela não estivesse bem enovelada e, com isso, impossibilitando a ligação dos nucleotídeos. As mesmas análises foram feitas para o complexo SEPT5-SEPT8(G).

A figura 33 mostra em A e B o espectro de CD do complexo SEPT5-SEPT8(G) e SEPT8(G), respectivamente. Podemos observar que tanto SEPT5-SEPT8(G) quanto SEPT8(G) exibem um espectro CD de uma proteína bem enovelada e ambas apresentando mínimos negativos em 222 e 208 nm, espectro característico de proteínas que contem como elementos de estrutura secundária hélices α . É visível a diferença entre o espectro de CD do complexo SEPT5-SEPT8(G) e SEPT8(G), observando um mínimo mais profundo em 208 nm para SEPT8(G), enquanto que no complexo SEPT5-SEPT8(G) apresenta um mínimo mais profundo em 222 nm. A diferença no espectro de CD observada entre SEPT5-SEPT8(G) e SEPT8(G) poderia estar justificada pela presença da SEPT5(G), no complexo. Há pelo menos duas alternativas. Ou a SEPT5(G) apresenta um espectro significativamente diferente da SEPT8(G) ou o primeiro induz uma mudança conformacional no último, acompanhando pela ligação do GTP. Pela dificuldade em obter amostras da SEPT5(G) sozinha de forma solúvel não foi possível realizar medidas de CD para resolver esta ambiguidade.

Após analisar os espectros de CD, as amostras foram submetidas a desnaturação térmica para estudos de termoestabilidade monitorada a 222nm e posteriormente seu espectro de CD foi medido novamente para verificar o efeito de altas temperaturas na estrutura. Na figura 33, em C e D, estão apresentadas as curvas de transição para SEPT5-SEPT8(G) e SEPT8(G), respectivamente. A temperatura de transição (T_m) foi de 45.4 °C para o complexo SEPT5-SEPT8(G) e de 40.0 °C para SEPT8(G), demonstrando uma maior estabilidade para o complexo SEPT5-SEPT8(G) com um ganho de 5,4 °C na T_m .

O espectro de CD medido após a desnaturação térmica mostra que tanto o complexo SEPT5-SEPT8(G) quanto SEPT8(G) apresentam um espectro de CD característico para proteínas com só folhas β como elementos de estrutura secundária. Esta característica já foi vista em SEPT4(G) quando é analisado seu espectro de CD entre 30 até 42 °C. Neste caso foi demonstrado que eles se comportam como estruturas do tipo amiloides. (78) Estas observações sugerem que ambas proteínas, após exceder a sua temperatura de transição, sofrem desestruturação possivelmente com tendências a formação de filamentos amiloides. Uma vez que as medidas do espectro de CD foram feitas após esfriamento das amostras (após a desnaturação térmica), os resultados revelam que tanto para o complexo quanto para SEPT8(G) o processo de desnaturação não é reversível.

Figura 33 - Espectros de dicroísmo circular. Em A e B os espectros de CD de SEPT5-SEPT8(G) e SEPT8(G), respectivamente. C e D mostram as curvas de desnaturação térmica para o complexo SEPT5-SEPT8(G) e SEPT8(G), respectivamente. Em E e F são mostrados os espectros de CD de SEPT5-SEPT8(G) e SEPT8(G), respectivamente, medidos após a desnaturação térmica.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como uma técnica alternativa para avaliar a termoestabilidade do complexo SEPT5-SEPT8(G) e de SEPT8(G), fluorimetria diferencial de varredura foi utilizada. Esta técnica permite determinar a termoestabilidade da proteína em uma determinada condição, no nosso caso, o tampão de purificação (tampão 4 da tabela 10), e com isto otimizar as chances de sucessos nos ensaios de cristalização.

A figura 34 mostra as diferenças em estabilidade do complexo SEPT5-SEPT8(G) frente a SEPT8(G). Podemos observar em A, que o complexo SEPT5-SEPT8(G) apresenta uma curva característica de proteínas estáveis (com uma T_m de 54,50 °C) no entanto SEPT8(G) apresenta uma curva de proteínas com estabilidade intermediária (com uma T_m de 49,50°C) (figura 34B) (ver curvas padrão na Figura 34C). (123) A cristalização do complexo SEPT5-SEPT8(G) e não de SEPT8(G), resultados mostrados na seguinte seção, pode estar relacionada com suas diferenças em estabilidade, uma vez que os ensaios de cristalização foram feitos para ambas proteínas no tampão 4 de purificação (o mesmo tampão utilizada para as medidas de estabilidade).

Figura 34 – Estabilidade térmica das proteínas no tampão de purificação. A) O gráfico de estabilidade do complexo SEPT5-SEPT8(G) mostra o comportamento de uma proteína estável no tampão com uma $T_m = 54,5$ °C. B) Gráfico de estabilidade de SEPT8(G) mostrando estabilidade intermedia quando comparado com os padrões com uma $T_m = 49,5$ °C. RFU: unidades de fluorescência relativas. As cores laranja e azul representam as medidas feitas em duplicata. C) Curvas padrões para uma proteína altamente termoestável no tampão (verde), proteína com termoestabilidade intermeia (amarelo) e instável (vermelho).

Fonte: Elaborada pelo autor (A e B); Adaptada de REINHARD et al. (C) (123)

Os resultados de termoestabilidade, mostram uma diferença de 5 °C na T_m utilizando ambas as técnicas, o que comprova que o complexo é mais estável e melhor comportado que SEPT8 como quando está isolada. As tentativas de análise para SEPT5(G) foram frustradas pelo fato de formar, na sua maior parte, agregados proteicos quando expressa e purificada. Por este motivo não podemos afirmar se SEPT5(G) é mais estável comparada com o complexo SEPT5-SEPT8(G), mas sim podemos dizer que ela é mais solúvel na presença do seu parceiro. Para o caso de SEPT8(G), foi observado que a adição de nucleotídeos (GDP ou GTP) não altera sua estabilidade térmica (120), coerente com o fato de não ser capaz de ligar os nucleotídeos. A presença do seu parceiro é fundamental para alcançar um aumento na sua estabilidade.

Como observado nos perfis de expressão, o complexo SEPT5-SEPT8(G) é uma molécula altamente solúvel e apresenta um único estado oligomérico. Por outro lado, tanto SEPT5(G) quanto SEPT8(G) quando expressas individualmente e tratadas nas mesmas condições que as do complexo, ficam praticamente insolúveis (Figura 24). Estes resultados eram indícios de que as proteínas apresentam uma maior solubilidade e estabilidade quando são co-expressas.

4.4 Cristalização do complexo SEPT5-SEPT8(G)

Com o intuito de pesquisar os determinantes estruturais da especificidade de interação entre SEPT5 e SEPT8 e a origem da maior estabilidade do heterodímero, ensaios de cristalização foram feitas com objetivo de obter cristais e a partir destes resolver a estrutura cristalográfica do complexo. Os ensaios de cristalização iniciais foram feitos com o complexo SEPT5-SEPT8(NGC) mas sem sucesso, observando sempre precipitados nas gotas montadas. Uma vez que a cristalização de domínios GTPases isolados de septinas tem apresentado maior sucesso (53,56,79), ensaios com o complexo SEPT5-SEPT8 contendo só os domínios GTPase foram feitos. O complexo SEPT5-SEPT8(G) resultou em cristais nos kits comerciais *Morpheus* e *JCSG + Suite* nas concentrações de 3,0 mg/mL e 2,5 mg/mL, respetivamente.

Para o kit *Morpheus* foram obtidos cristais nas condições G7 (10% PEG4000, 20% glicerol, 0.02 M ácidos carboxílicos, 0.1 M MOPS/HEPES-Na pH 7.5). Cristais foram retirados cuidadosamente da gota de cristalização (Figura 35) e congelados em nitrogênio líquido para coleta de dados no sincrotron *Diamond*, Inglaterra. Não foi possível obter algum conjunto de dados com a qualidade suficiente para o processamento e resolução da estrutura cristalográfica do complexo, sendo que a melhor resolução observada foi aproximadamente 12 Å. Refinamento das condições G7 foram feitos como descritos na tabela 6 variando a concentração da proteína e incluindo a adição de nucleotídeos (GTP, GDP e uma mistura dos dois) e até foi testada a técnica de *seeding*, mas sem maiores sucessos. Uma vez que os cristais continuavam tendo o mesmo tamanho como observado no *screening*, não foi possível testar as novas condições no sistema de coleta *In House* do nosso laboratório. Novos testes de cristalização serão realizados no futuro além de testar outras combinações dos membros dos grupos II e grupo III.

Figura 35 - Cristais obtidos pelo *screening* com o kit *Morpheus* na condição G7

Fonte: Elaborada pelo autor.

Observando que os cristais obtidos com as condições do kit *Morpheus* não apresentavam melhoras, testes de cristalização foram feitos com o kit *JCSG + Suite*. Cristais foram obtidos na condição E3 (0.2 M Cloreto de sódio, 0.1 M HEPES pH 7.5, 10% isopropanol) e posteriormente refinada como descritos na tabela 7. Foi

observado que diminuindo a concentração da proteína permitia obter cristais de maior tamanho comparados com as do kit *Morpheus* e as condições do *screening* de *JCSG + Suite*. Assim, os melhores cristais obtidos foram nas condições A1 e A2 da tabela 7 e com uma concentração de 1,8 mg/mL do complexo SEPT5-SEPT8(G) (Figura 36). Ainda ensaios de coleta não foram feitos, uma vez que os cristais continuam sendo pequenos para ser testados no sistema *In House*.

Figura 36 - Cristais obtidos no refinamento das condições do kit JCSG Suite. A) Condição A1 do refinamento. B) Condição A2 do refinamento.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5 Modelagem por homologia

Entender as bases moleculares da montagem correta de um heterofilamento de septinas é um dos maiores desafios até hoje. Isto é devido ao fato da estrutura cristalográfica do complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7 revelar que existe uma ordem específica para a montagem do filamento, mas não fornece os detalhes das interações envolvidas. Isto é devido à baixa resolução da estrutura (4Å) que impossibilita observar as cadeias laterais de todos os aminoácidos das subunidades presentes no complexo. (76) A complexidade deste problema é destacada pela observação das mesmas interfaces NC e G em estruturas cristalográficas de domínios G isolados de diversas septinas (o que são chamadas de interações promiscuas). (72,77-78) Nossas tentativas de entender especificamente as interações envolvidas na interface G entre septinas dos grupos II e III, através da determinação da estrutura cristalográfica do complexo SEPT5-SEPT8(G) foram frustradas devido à dificuldade em obter cristais de boa qualidade. Por este motivo,

iniciou-se um estudo de modelagem por homologia das interfaces G em uma tentativa de responder estas questões.

O alinhamento (editado em base das estruturas cristalográficas conhecidas de septinas) entre as sequências de aminoácidos do domínio GTPase das 13 septinas humanas e *SmSEPT10* permitiu, além de identificar resíduos característicos para cada grupo, analisar em detalhe os motivos estruturais: *P-loop*, *Switch I*, *Switch II*, *G4* e *S1-S4* (Figura 37). Para relembrar, um resíduo característico é aquele conservado para um grupo (estando presente em todas as septinas pertencentes ao grupo) mas ausente em septinas dos outros grupos. Assim, foram identificados 15 resíduos característicos para o grupo III (da SEPT2 em vermelho), 34 para o grupo II (da SEPT6 em azul), 21 para o grupo I (da SEPT9 em verde) e 47 para o grupo IV (da SEPT7 sozinha em amarelo); o número elevado encontrado para SEPT7 é porque é a única representante do seu grupo e, portanto, estes resíduos característicos têm que ser tratados com cautela por falta de robustez estatística. O alinhamento mostra que o motivo *P-loop* é muito bem conservado nas septinas humanas, mas é possível observar que os grupos II (da SEPT6) e I (da SEPT9) apresentam resíduos característicos neste motivo. No *Switch I* observamos: Thr51 conservada nos grupos I, III e IV (resíduo que confere a atividade catalítica), o grupo II da SEPT6 perdeu 5 resíduos neste motivo (o que está relacionado com a incapacidade de hidrolisar o GTP). O motivo *Switch II* é conservado nas 13 septinas humanas, mas com uma peculiaridade no caso do grupo da SEPT6, uma prolina (Pro76) que é conservada em todos os outros grupos foi trocada por uma valina, resultando em um resíduo característico para este grupo. Podemos relacionar este aminoácido, como explicado na seção 4.3.3, também com a incapacidade da SEPT8(G) de manter o GTP ligado. Os motivos *S1-S4* são muito conservados nas treze septinas humanas, mas observamos que no *S1* o grupo da SEPT2 e SEPT6 apresentam resíduos característicos. Finalmente o motivo *G4* apresenta em todas as septinas o consenso “AKAD” que confere a septinas a especificidade para os nucleotídeos de guanina.

Figura 37 - Alinhamento estrutural entre as 13 septinas humanas e SmSEPT10 (usado para a modelagem). Os aminoácidos conservados para cada grupo de septinas estão ressaltados em diferentes cores: vermelho, amarelo, azul e verde para os grupos da SEPT2, SEPT7, SEPT6 e SEPT9 respectivamente. Os elementos de estrutura secundária estão mostrados em base a sequência de SmSEPT10: em laranja folhas- β e em roxo as α -hélices. As regiões importantes e comuns para as pequenas GPTases estão mostradas em caixas transparentes, no entanto, os motivos únicos em septinas em caixas sombreadas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Um representante de cada grupo foi escolhido para gerar as 10 diferentes combinações, sendo elas SEPT2 (grupo III), SEPT6 grupo II), SEPT7 (grupo IV) e SEPT9 (grupo I). Cinquenta modelos para cada uma das dez diferentes combinações possíveis (canônicas e não canônicas) mostradas na tabela 8 foram feitas usando o programa Modeller. Os critérios de avaliação do melhor modelo, para cada um dos dez dímeros propostos, indicam que todos os melhores modelos (das dez diferentes combinações) estão dentro dos padrões de boa qualidade mostrando: um G-factor em média para os 10 modelos de -0,10 (equivalente ao esperado para estruturas de $< 1,5 \text{ \AA}$), a pontuação do Verify3D está entre 81.04% e 95.12% (estando dentro dos valores esperados) e os valores de Z-score do What_Check tem uma média de 1.6 (valores >0 indicam modelos de boa qualidade). Todos os valores de qualidade média dos dez modelos estão mostrados na tabela 17. Pelo filamento canônico (Figura 10), espera-se interfaces G apenas entre SEPT2-SEPT6 e SEPT7-SEPT9. Todas as outras combinações foram feitas como controles para identificar se de fato, interações favoráveis e específicas existiam apenas nas interfaces G canônicas (fisiologicamente esperadas).

Tabela 17 - Lista de valores obtidos para avaliação da qualidade dos modelos

	G-Factor	What_Check
	do	Ramachandran
	Procheck	Z - score
SEPT2-SEPT2	-0.10	89.37 %
SEPT2-SEPT7	-0.10	82.68 %
SEPT2-SEPT6	-0.10	89.76 %
SEPT2-SEPT9	-0.11	91.73 %
SEPT7-SEPT7	-0.08	95.12 %
SEPT7-SEPT6	-0.11	90.91 %
SEPT7-SEPT9	-0.04	81.04 %
SEPT6-SEPT6	-0.11	88.14 %
SEPT6-SEPT9	-0.09	92.09 %
SEPT9-SEPT9	-0.11	83.67 %

Fonte: Elaborada pelo autor

Uma vez confirmada a qualidade dos modelos, os resíduos característicos para cada um dos grupos foram mapeados nas dez diferentes combinações. Assim, observamos para as interfaces G canônicas (SEPT2-SEPT6 e SEPT7-SEPT9) as seguintes interações: para SETP2-SEPT6 notamos uma interação hidrofóbica na interface G entre os resíduos característicos Phe131 da SEPT2 e Thr19 da SEPT6 (Figura 38A) e para SEPT7-SEPT9 uma interação entre os resíduos característicos Ser131 da SEPT7 e Gln18 da SEPT9 (Figura 38C). Para avaliar a constância destas interações, os dez melhores modelos dos cinquenta gerados para cada combinação foram analisados. A interação em SEPT2-SEPT6, que foi vista em 4 dos 10 melhores modelos, mostra um contato de Van der Waals entre o anel aromático da Phe131 e o grupo metil da Thr19, o qual poderia ocorrer unicamente entre septinas destes grupos uma vez que se trata de resíduos característicos. Para manter a orientação do grupo metil da Thr19 apontando para a Phe131, o grupo hidroxila dela tem que estar segurado por um contato direto com o γ fosfato do GTP (em dois dos quatro modelos) ou por meio de uma interação indireta através de uma molécula de água (água estrutural vista em *SmSEPT10* – 4KVA) que coordena com o γ fosfato (nos dois modelos restantes) (Figura 38B). Para SEPT7-SEPT9, a interação entre os resíduos característicos Ser131 e Gln18 ocupa uma posição similar à descrita anteriormente, mas esta interação é possível realizando pequenos ajustes nas orientações dos resíduos encontrados nos modelos, o que finalmente permite a formação de uma ponte de hidrogênio entres os dois aminoácidos (Figura 38D). Esta interação foi encontrada apenas em 2 dos 10 modelos.

Figura 38 - Interação entre os aminoácidos específicos dos complexos SEPT2-SEPT6(G) e SEPT7-SEPT9(G). A e C representam as estruturas em superfície dos complexos SEPT2-SEPT6 e SEPT7-SEPT9 respectivamente. Os aminoácidos característicos para cada um dos grupos estão coloridos nas estruturas. Os monômeros do dímero foram afastados e subsequentemente rotacionados por 90° com o objetivo de observar a superfície em cada um que faz parte da interface. As flechas indicam um contato direto entre aminoácidos característicos dos complexos. Os contatos identificados entre aminoácidos específicos para estes complexos estão mostrados em B e D.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a combinação SEPT7-SEPT7, onde uma interface G foi observada no complexo hexamérico SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT7-SEPT6-SEPT2 (76), não foi possível observar interações que envolvam resíduos característicos na interface G, uma vez que a Ser131 (homologo da Phe131 da SEPT2) está distante como para formar uma ponte de hidrogênio com seu equivalente da outra subunidade. Ainda não se sabe se filamentos contendo septinas de apenas três dos quatro grupos são fisiológicos ou não e, portanto, a eventual interface G entre duas cópias de SEPT7 encontrada na estrutura cristalográfica pode ainda ser promiscua.

Com fins de avaliar as interações observadas, combinações não canônicas (que vão contra as regras de Kinoshita) foram feitas e os resíduos característicos foram

mapeados. Os homodímeros formados pelas SEPT2 e SEPT9 não apresentam interações que possam envolver resíduos característicos. Para os heterodímeros, SEPT2-SEPT7 e SEPT2 SEPT9 não reproduzem a interação mostrada para SEPT2-SEPT6 uma vez que a Thr19 está ocupada por uma Ser em SEPT7 e SEPT9, impossibilitando a formação do contato com Phe131 de SEPT2; para SEPT6-SEPT6 e SEPT6-SEPT9 interações potenciais não foram observadas e finalmente para SEPT6-SEPT7 uma possível interação entre os grupos hidroxila da Ser131 e Thr19 é descartada uma vez que a hidroxila da Thr19 estaria interagindo com o GTP (como descrito no complexo SEPT2-SEPT6).

Como mostramos, o dímero que exibe uma interação mais notável envolvendo resíduos característicos é o dímero SEPT2-SEPT6. Assim, para explorar se esta interação também se encontraria em dímeros feitos envolvendo todas as combinações dos membros dos grupos II e III (como previsto pelas regras de Kinoshita), todas as demais combinações restantes (19 combinações, uma vez que SEPT2-SEPT6 foi utilizada como exemplo) foram modeladas e a interação entre Phe131 e Thr19 foi analisada para os 10 melhores modelos (dos 50 gerados) de cada combinação. As 20 combinações esperadas entre septinas do grupo II e III vem do fato que o grupo II apresenta 5 membros enquanto que o grupo III apresenta 4 membros. A figura 39 mostra que a interação entre Phe131 e Thr19 aparece em entre 20 e 80% dos 10 melhores modelos de cada combinação. Os resultados, portanto, permitem especular que esta interação seja um dos elementos importantes que garantem a formação de uma interface do tipo G entre septinas dos grupos II e III, algo fundamental na formação de um filamento fisiológico.

Figura 39 - Porcentagem de ocorrência da interação Phe131 e Thr19 vista nos dez melhores modelos para cada uma das combinações possíveis entre as septinas dos grupos II e III. Em média, em 108 dos 200 dímeros a interação entre Phe131 e Thr19 é mantida.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Estes resultados, além de propor uma interação que proporcionaria a especificidade entre septinas do grupo II e o grupo III, também nos permitem admitir a hipótese da importância da incapacidade de hidrolisar o GTP por parte de septinas do grupo III. A rede de interação entre SEPT2-SEPT6 envolve a Phe131, Thr19 e o γ fosfato do GTP, onde é este último segura a Thr19 na posição certa para interagir com Phe131 (Figura 38B). No caso de que SEPT6 tivesse atividade catalítica e hidrolisasse o GTP para GDP, a interação que mantém a cadeia lateral de Thr19 na orientação adequada para interagir com Phe131 estaria ausente. Estas observações podem ajudar a explicar o porquê SEPT6 (no nosso caso SEPT8) é incapaz de ligar GTP na ausência de SEPT2. Uma vez que o GTP faz parte de uma rede de interações que envolve Phe131, é possível especular que na ausência de Phe a afinidade pelo GTP é reduzida. Assim, podemos acreditar que todo acontece ao mesmo tempo: a interação específica entre Phe131 e Thr19, que precisa da

presença do γ fosfato e que a capacidade de ligar GTP precisa da presença de Phe131.

A estrutura cristalográfica do complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7 já mostrou inicialmente quais são os contatos que mediam a interface G entre SEPT2 e SEPT6. Então, por que não foi vista a interação proposta? Primeiro, dada a baixa resolução da estrutura a cadeia lateral da Thr19 não foi vista e segundo porque Phe131 se encontra em uma orientação distinta, apontando para o meio da interface G (como vista na estrutura de SEPT2 homodimerica – 2QA5, onde a Phe131 faz uma interação de *stacking* com ela mesma da outra subunidade). Esta diferença na orientação da Phe131 pode ser pelo fato de que a estrutura cristalográfica de SEPT2 (2QA5) foi utilizada como modelo para substituição molecular durante a resolução da estrutura do complexo, assim Phe131 adota a mesma orientação já que não apresenta densidade suficiente para modelar a cadeia lateral dela no complexo. (76)

Pela primeira vez, nesta dissertação de mestrado, é apresentada uma explicação da relevância funcional da falta de atividade catalítica apresentada pelos membros do grupo II de septinas.

4.6 Expressão e purificação dos complexos mutantes

Os resultados obtidos na modelagem por homologia sugerem que a especificidade entre septinas do grupo II e III é mediada pela interação entre Phe131 conservada em septinas do grupo III e Thr19 em septinas do grupo II. Mutações nestes aminoácidos no complexo SEPT5-SEPT8(NGC) foram feitas para avaliar esta hipótese.

Phe131 de SEPT5 foi mutada por Thr, aminoácido conservado em todos os outros grupos de septinas humanas, e a Thr19 de SEPT8 por Ser (também conservada em todos os outros grupos). Assim, as combinações SEPT5F131T-SEPT8, SEPT5-SEPT8T19S e SEPT5F131T-SEPT8T19S foram co-expressas e co-purificadas como descritas para o complexo nativo.

As figuras 40, 41 e 42 mostram os resultados da co-expressão e co-purificação dos complexos mutantes. Podemos observar em 40A que o complexo entre SEPT8 e SEPT5 mutante co-purificado por cromatografia de afinidade a cobalto indica que a interação entre as proteínas ainda existe porque co-eluem as duas proteínas sendo

que apenas SEPT8 apresenta a cauda de histidina como nos casos anteriores. Uma vez injetada a amostra eluída da afinidade na coluna de exclusão molecular podemos observar uma diferença no perfil comparado com as proteínas nativas, observando dois únicos picos não totalmente resolvidos (figura 40C). O pico I estaria relacionado com agregados proteicos, observando no gel SEPT5 e SEPT8 não equimolares, e o pico II (um pico não resolvido totalmente) mostra no gel a presença praticamente só de SEPT8 (figura 40B).

SEPT5F/T-SEPT8

Figura 40 - Expressão e purificação do complexo mutante SEPT5F/T-SEPT8(NGC). A) SDS-PAGE 10% das alíquotas coletadas durante a purificação por afinidade. É observado que a mutação não quebra a interação entre as duas proteínas porque estão co-eluído. P: fração insolúvel, S: fração solúvel, NL: proteínas que não interagem com o cobalto imobilizado na resina, L1 e L2: lavagens, E1 e E2 eluições com 250 de imidazol; E3 eluição com 500 mM de imidazol. M: marcador de massa molecular. B) SDS-PAGE 10% das alíquotas coletadas da purificação por exclusão molecular. No pico I é observado a eluição de ambas proteínas, no entanto, no pico II somente SEPT8. C) Cromatograma da purificação por exclusão molecular (Superdex 200 10/300 GL) do mutante SEPT5F/T-SEPT8. O perfil é diferente quando comparado com o do complexo nativo mostrado à direita.

Fonte: Elaborada pelo autor.

SEPT5-SEPT8T/S

Figura 41 - Expressão e purificação do complexo mutante SEPT5-SEPT8T/S(NGC). A) SDS-PAGE 10% das alíquotas coletadas durante a purificação por afinidade. É observado que a mutação não quebra a interação entre as duas proteínas porque estão co-eluído. P: fração insolúvel, S: fração solúvel, NL: proteínas que não interagem com o cobalto imobilizado na resina, L1 e L2: lavagens, E1 e E2 eluições com 250 de imidazol; E3 eluição com 500 mM de imidazol. M: marcador de massa molecular. B) SDS-PAGE 10% das alíquotas coletadas da purificação por exclusão molecular. No pico I é observado a eluição de ambas proteínas, no entanto, no pico II SEPT8T/S está presente em maior proporção que SEPT5. C) Cromatograma da purificação por exclusão molecular (Superdex 200 10/300 GL) do mutante SEPT5-SEPT8T/S. O perfil é diferente quando comparado com o do complexo nativo mostrado à direita.

Fonte: Elaborada pelo autor

Para o complexo onde só SEPT8 está mutada podemos observar uma co-purificação não equimolar durante a cromatografia de afinidade (figura 41A) e com mudanças do perfil de purificação durante a exclusão molecular (figura 41C). Assim podemos observar dois picos, o pico I que representa agregados proteicos o qual apresenta as duas proteínas de forma equimolar e o pico II que apresenta predominantemente SEPT8, como mostrado no gel na figura 41B

Finalmente para o caso do mutante duplo, podemos observar ainda a co-purificação do complexo durante a cromatografia de afinidade (figura 42A), mas durante a exclusão molecular apresenta um perfil similar ao visto no mutante simples SEPT5F131T (figura 42C), observando no gel que no pico I elui as duas proteínas e, no entanto, no pico II unicamente SEPT8 (figura 42B).

Figura 42 - Expressão e purificação do complexo mutante SEPT5F/T-SEPT8T/S(NGC). A) SDS-PAGE 10% das alíquotas coletadas durante a purificação por afinidade. É observado que a mutação não quebra a interação entre as duas proteínas porque estão co-eluído. P: fração insolúvel, S: fração solúvel, NL: proteínas que não interagem com o cobalto imobilizado na resina, L1 e L2: lavagens, E1 e E2 eluições com 250 de imidazol; E3 eluição com 500 mM de imidazol. M: marcador de massa molecular. B) SDS-PAGE 10% das alíquotas coletadas da purificação por exclusão molecular. No pico I é observado a eluição de ambas proteínas, no entanto, no pico II somente SEPT8T/S. C) Cromatograma da purificação por exclusão molecular (Superdex 200 10/300 GL) do mutante SEPT5F/T-SEPT8T/S. O perfil é diferente quando comparado com o do complexo nativo mostrado à direita.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Estes resultados mostram que as mutações não quebram a interação entre SEPT5 e SEPT8, mas que provavelmente altera a afinidade entre as duas proteínas, sendo que de forma qualitativa a mutação em Phe131 tem consequências maiores na estabilidade do complexo e, com isso, talvez tenha uma maior importância na estabilização do complexo.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho são apresentados os resultados de caracterização biofísica e estrutural (bioinformática) do complexo formado pelos domínios GTPase das septinas 5 e 8 (SEPT5-SEPT8). Também são mostrados os resultados obtidos para SEPT8(G) com fins comparativos frente ao complexo SEPT5-SEPT8(G).

Inicialmente foi clonado, co-expresso e co-purificado o complexo formado pelas SEPT5 e SEPT8 contendo seus três domínios (N, G e C). A partir de estudos do estado oligomérico e homogeneidade em solução, concluímos que o complexo provavelmente é um tetrâmero, com uma mistura de dímeros em solução o que o caracteriza como uma amostra polidispersa, dificultando a continuidade dos estudos biofísicos e estruturais. Esta polidispersidade foi confirmada por AUC. Baseado nas regras de Kinoshita, a estrutura mais provável para este tetrâmero hipotético seria um arranjo linear, moderadamente alongado, do tipo (SEPT8-SEPT5-SEPT5-SEPT8). Qualquer oligômero maior que um tetrâmero necessitaria do uso de interfaces não canônicas (e portanto provavelmente não fisiológicas). A dificuldade em trabalhar com as construções inteiras talvez seja justamente devido a falta de um parceiro adequado para SEPT8, particularmente o seu domínio C-terminal que, em filamentos fisiológicos, formaria um coiled-coil com a SEPT7.

Pela falta de sucesso com as septinas inteiras, uma construção contendo só os domínios GTPase de SEPT5 e SEPT8 foi clonada. O complexo SEPT5-SEPT8(G) foi clonado, co-expresso e co-purificado com sucesso. Os estudos de estado oligomérico e homogeneidade concluem que forma um dímero monodisperso em solução. Porém, como no caso das proteínas inteiras, a massa molecular do complexo é superestimada (SEC= 81KDa; DLS= 99 KDa) em relação à massa teórica (68 KDa). Isto é coerente com os resultados de AUC que indicam que o complexo é moderadamente alongado (e por isso pode ser superestimada a massa por SEC e DLS). Os estudos biofísicos e estruturais, portanto, foram continuados com o complexo SEPT5-SEPT8(G).

Uma vez que SEPT8(G) elui em excesso durante a SEC, foi utilizada para fazer estudos comparativos contra o complexo SEPT5-SEPT8(G). Ela elui como um

monômero (36 KDa) em solução como confirmado pela SEC (Massa molecular teórica: 33KDa).

A análise de conteúdo de nucleotídeo mostra que o complexo SEPT5-SEPT8(G) apresenta tanto GTP quanto GDP ligado (como observado no complexo SEPT2-SEPT6) (73,76). Por outro lado, SEPT8(G) está na sua forma apo. Os experimentos de MST, confirmaram que SEPT8(G) na sua forma monomérica não apresenta nenhuma afinidade mensurável por GTP ou GDP. Da mesma forma, os estudos de estabilidade mostram que o complexo SEPT5-SEPT8(G) ($T_m=54,5$) é significativamente mais estável comparado com SEPT8(G) monomérica ($T_m=49,5$). Estes resultados permitem concluir que, para que SEPT8(G) possa ligar o GTP o seu parceiro SEPT5(G) tem que estar presente, assim permitindo a formação e estabilização do complexo.

Cristais do complexo SEPT5-SEPT8(G) foram obtidos nas condições: 10% PEG4000, 20% glicerol, 0.02 M ácidos carboxílicos, 0.1 M MOPS/HEPES-Na pH 7.5 e 0.2 M Cloreto de sódio, 0.1 M HEPES pH 7.5, 10% isopropanol mas difrataram a baixa resolução. Refinamento das condições de cristalização ainda estão sendo feitas.

O estudo de modelagem por homologia permitiu identificar aminoácidos característicos para cada um dos grupos de septinas (resíduos presentes em todos os integrantes de um determinado grupo e ausentes de todos os demais). Assim, foi identificada uma interação característica entre Phe131 de SEPT2 (septinas do grupo III) e Thr19 de SEPT6 (septinas do grupo II). Esta interação é mediada pelo γ fosfato do GTP, tornando assim o GTP como um “resíduo” característico para septinas do grupo II uma vez que estes não apresentam atividade catalítica. Os resultados obtidos permitem propor, pela primeira vez, a importância funcional da perda de atividade catalítica das septinas do grupo II e além disto propor uma interação que embute especificidade à interface G canônica entre septinas do grupo II e grupo III.

Finalmente, mutações em Phe131 da SEPT5 por Thr e Thr19 da SEPT8 por Ser, mostram um perfil de expressão e purificação diferente ao comparar com o complexo formado pelas proteínas nativas. Isto permite concluir, de forma

qualitativa, que a interação entre Phe131 e Thr19 é importante para a estabilização do complexo.

A figura 43 resume os resultados obtidos neste trabalho e a sua relação com a montagem de um hetero-filamento contendo integrantes dos grupos II, III e IV (SEPT7). O modelo se baseia na estrutura cristalográfica do complexo SEPT2, SEPT6 e SEPT7. Porém, até hoje sabe-se pouco sobre a sequência de eventos envolvidos neste processo. O esquema mostra dois possíveis caminhos (embora outras alternativas existem). Na etapa I, as septinas isoladas tendem a serem menos estáveis (indicado pela superfície rugosa). Isto foi conclusivamente mostrado no presente estudo para o caso da SEPT8 (grupo II), que nesta etapa se encontra sem nucleotídeo ligado, enquanto que os demais já estão na forma holo (ligadas a GDP).

Durante a segunda etapa, dímeros do tipo II/IV (estabilizado pelo *coiled-coil* do C-terminal) ou II/III (como o complexo SEPT5-SEPT8 estudado aqui) representam intermediários em caminhos alternativos. No caso do complexo II/III, a ligação do GTP à septina do grupo II deve acontecer simultaneamente com a formação do dímero, estabilizado pela interação específica entre Phe131 (grupo III) e Thr19 (grupo II). A presença do GTP ligada a septina II é essencial para a formação da rede de interações envolvendo o contato específico com a septina III e, por outro lado, a presença da septina III é essencial para a ligação do GTP. Os complexos resultantes são mais estáveis, indicado pela superfície menos rugosa.

Pelo caminho alternativo, ainda não se sabe se a formação de um eventual dímero II/IV poderia afetar a afinidade da septina II por GTP. Porém, não é totalmente implausível uma vez que comunicação entre interfaces consecutivas ao longo de um filamento foi postulado recentemente baseado na estrutura cristalográfica da SEPT10 de *S. mansoni*.

Na última etapa o trímero é formado seguindo qualquer das duas vias mostradas. O complexo atinge finalmente o grau de estabilidade maior.

Figura 43 - Proposta para polimerização de um complexo canonico de septinas baseada na estrutura cristalografico do complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7. Na etapa I podemos observar o seguinte: Cada um dos grupos de septinas que formam o filamento estão representado em cores: grupo IV em amarelo (da SEPT7), grupo II em azul (da SEPT6) e em vermelho o grupo III (da SEPT2). Na etapa I elas se encontram na sua forma de mais baixa estabilidade onde os grupos III e IV estão ligados a GDP (D) e o grupo II na sua forma apo. Podemos observar os residuos caracteristicos para o grupo II (Thr19 em bola laranja) e grupo III (Phe131 em bola verde), estes residuos são propostos para conferir especificidade à interação entre septinas dos grupos mencionados. Na etapa II é mostrada o formação dos complexos diméricos o que induz à ligação do GTP (T) em septinas do grupo II. Finalmente na etapa II as septinas atingem seu maior nível de estabilidade na forma de um complexo trimérico. *O grau de estabilidade aumenta quando a superfície da proteína fica menos rugosa: etapa I mais rugosa comparada com etapa III.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6 PERSPECTIVAS

- ✓ Explorar outras condições de expressão e purificação de SEPT5(G), com fins de aumentar a sua solubilidade e permitir realizar estudos biofísicos e estruturais (como feitos para SEPT8(G)) para comparar com o complexo SEPT5-SEPT8(G). Além disso, outras construções contendo os diferentes domínios podem ser testadas: SEPT5(NG) e SEPT5(GC).
- ✓ Realizar uma mutação na Val conservada no *Switch II* de SEPT8(G) e avaliar se existe um aumento de afinidade pelos nucleotídeos.
- ✓ Inserir os 5 aminoácidos ausentes no *Switch I* de SEPT8(G), inclusive a treonina, com o objetivo de proporcionar-lhe atividade catalítica. Se for bem-sucedido, verificar se SEPT8(G) ainda é capaz de formar um complexo com SEPT5(G).
- ✓ Explorar mais condições de cristalização para o dímero SEPT5-SEPT8(G).
- ✓ Realizar as mutações em Phe131 e Thr19 em SEPT5(G) e SEPT8(G), respectivamente, e avaliar a formação do complexo co-expressando e co-purificando o complexo.
- ✓ Tentar estimar as afinidades entre SEPT5 e SEPT8 nos complexos nativos e mutantes usando, ultracentrifugação analítica, ressonância plasmônica de superfície e termoforese em microescala.
- ✓ Estender os experimentos biofísicos e de cristalização para outras septinas do mesmo grupo II e III, por exemplo, SEPT2 e SEPT6.

REFERÊNCIAS

- 1 HARTWELL, L.H. **Genetic control of the cell division cycle in yeast**. 1971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1212945/pdf/267.pdf>>. Acesso em: 15 de abril 2016.
- 2 BYERS, B.; GOETSCH, L. A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. **Journal of Cell Biology**, v.69, p.717-21, 1976.
- 3 HAARER, B.K.; PRINGLE, J.R. Immunofluorescence localization of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. **Molecular and Cell Biology**, v.7, n.10, p.3678-87, 1987.
- 4 CAO, L.; DING, X.; YU, W.; YANG, X.; SHEN, S.; YU, L. Phylogenetic and evolutionary analysis of the septin protein family in metazoan. **FEBS Letters**, v.581, n.28, p.5526-32, 2007.
- 5 PAN, F.; MALMBERG, R.L.; MOMANY, M. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. **BMC Evolutionary Biology**, v.7, n.103. 2007.
- 6 YAMAZAKI, T.; OWARI, S.; OTA, S.; SUMIYA, N.; YAMAMOTO, M.; WATANABE, K.; NAGUMO, T.; MIYAMURA, S.; KAWANO, S. Localization and evolution of septins in algae. **Plant Journal**, v.74, n.4, p.605-14, 2013.
- 7 WŁOGA, D.; STRZYZEWSKA-JÓWKO, I.; GAERTIG, J.; JERKA-DZIADOSZ, M. Septins stabilize mitochondria in *Tetrahymena thermophila*. **Eukaryotic Cell**, v.7, n.8, p.1373-86, 2008.
- 8 NISHIHAMA, R.; ONISHI, M.; PRINGLE, J.R. New insights into the Phylogenetic distribution and evolutionary origins of the Septins. **Biological Chemistry**, v.72, n.2, p.181-204, 2011.
- 9 BERTIN, A.; MCMURRAY, M.A.; GROB, P.; PARK, S-S.; GARCIA, G.; PATANWALA, I.; NG, H-L.; ALBER, T.; THORNER, J.; NOGALES, E. *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.105, n.24, p.8274-9, 2008.
- 10 WEEMS, A.D.; JOHNSON, C.R.; ARGUESO, J.L.; MCMURRAY, M.A. Higher-order septin assembly is driven by GTP-promoted conformational changes: Evidence from unbiased mutational analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v.196, n.3, p.711-27, 2014.
- 11 BOOTH, E.A.; VANE, E.W.; DOVALA, D.; THORNER, J. A forster resonance energy transfer (FRET)-based system provides insight into the ordered assembly of

yeast septin hetero-octamers. **Journal of Biological Chemistry**, v.290, n.47, p.28388-401, 2015.

12 HEASLEY, L.R.; MCMURRAY, M.A. Roles of septins in prospore membrane morphogenesis and spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, v.27, n.3, p.442-50, 2015.

13 DOUGLAS, L.M.; KONOPKA, J.B. Plasma membrane organization promotes virulence of the human fungal pathogen *Candida albicans*. **Journal of Microbiology**, v.54, n.3, p.178-91, 2016.

14 VARGAS-MUÑIZ, J.M.; RENSHAW, H.; RICHARDS, A.D.; LAMOTH, F.; SODERBLOM, E.J.; MOSELEY, M.A.; JUVVADI, P.R.; STEINBACH, W. The *Aspergillus fumigatus* septins play pleiotropic roles in septation, conidiation, and cell wall stress, but are dispensable for virulence. **Fungal Genetics and Biology**, v.81, p.41-51, 2015.

15 GUPTA, Y.K.; DAGDAS, Y.F.; MARTINEZ-ROCHA, A.-L.; KERSHAW, M.J.; LITTLEJOHN, G.R.; RYDER, L.S.; SKLENAR, J.; MENKE, F.; TALBOT, N. Septin-dependent assembly of the exocyst is essential for plant infection by *Magnaporthe oryzae*. **Plant Cell**, v.27, n.11, p.3277-89, 2015.

16 NGUYEN, T.Q.; SAWA, H.; OKANO, H.; WHITE, J.G. The *C. elegans* septin genes, *unc-59* and *unc-61*, are required for normal postembryonic cytokinesis and morphogenesis but have no essential function in embryogenesis. **Journal of Cell Science**, v.113, p.3825-37, 2000.

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

18 ADAM, J.C.; PRINGLE, J.R.; PEIFER, M. Evidence for functional differentiation among *Drosophila* septins in cytokinesis and cellularization. **Molecular Biology of the Cell**, v.11, n.9, p.3123-35, 2000.

19 AKHMETOVA, K.; BALASOV, M.; HUIJBREGTS, R.P.H.; CHESNOKOV, I. Functional insight into the role of Orc6 in septin complex filament formation in *Drosophila*. **Molecular Biology of the Cell**, v.26, n.1, p.15-28, 2015.

20 ZERAIK, A.E.; RINALDI, G.; MANN, V.H.; POPRATILOFF, A.; ARAUJO, A.P.U.; DEMARCO, R.; BRINDLEY, P.J. Septins of Platyhelminths: identification, Phylogeny, expression and localization among developmental stages of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.7, n.12, p.1-14, 2013.

21 LI, S.; OU, X.H.; WEI, L.; WANG, Z.B.; ZHANG, Q.H.; OUYANG, Y.C.;

SCHATTEN, H.; SUN, Q-Y. Septin 7 is required for orderly meiosis in mouse oocytes. **Cell Cycle**, v.11, n.17, p.3211-8, 2012.

22 AGETA-ISHIHARA, N.; MIYATA, T.; OHSHIMA, C.; WATANABE, M.; SATO, Y.; HAMAMURA, Y.; HIGASHIYAMA, T.; MAZITSCHKE, R.; BITO, H.; KINOSHITA, M. Septins promote dendrite and axon development by negatively regulating microtubule stability via HDAC6-mediated deacetylation. **Nature Communications**, v.4, n.2532, 2013.

23 KUSCH, J.; MEYER, A.; SNYDER, M.P.; BARRAL, Y. Microtubule capture by the cleavage apparatus is required for proper spindle positioning in yeast. **Genes & Development**, v.16, n.13, p.1627-39, 2002.

24 SPILIOTIS, E.T. A Mitotic Septin scaffold required for Mammalian Chromosome congression and segregation. **Science**, v.307, n.5716, p.1781-5, 2005.

25 KINOSHITA, M.; NODA, M. Roles of septins in the mammalian cytokinesis machinery. **Cell Structure and Function**, v.26, n.6, p.667-70, 2001.

26 SURKA, M.C.; TSANG, C.W.; TRIMBLE, W.S. The Mammalian Septin MSF localizes with microtubules and is required for completion of cytokinesis. **Molecular Biology of the Cell**, v.13, p.3532-45, 2002.

27 DOBBELAERE, J. Spatial coordination of cytokinetic events by compartmentalization of the cell cortex. **Science**, v.305, n.5682, p.393-6, 2004.

28 LONGTINE, M.S.; THEESFELD, C.L.; MCMILLAN, J.N.; WEAVER, E.; PRINGLE, J.R.; LEW, D.J. Septin-dependent assembly of a cell cycle-regulatory module in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v.20, n.11, p.4049-61, 2000.

29 FINGER, F.P.; KOPIK, K.R.; WHITE, J.G. A role for septins in cellular and axonal migration in *C. elegans*. **Developmental Biology**, v.262, n.1, p.220-34, 2003.

30 BRIDGES, A.A.; ZHANG, H.; MEHTA, S.B.; OCCHIPINTI, P.; TANI, T.; GLADFELTER, A.S. Septin assemblies form by diffusion-driven annealing on membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.111, n.6, p.2146-51, 2014.

31 HU, Q.; MILENKOVIC, L.; JIN, H.; SCOTT, M.P.; NACHURY, M.V.; SPILIOTIS, E.T.; NELSON, W.J. A Septin diffusion barrier at the base membrane protein distribution. **Science**, v.329, p.426-9, 2010.

32 SCHMIDT, K.; NICHOLS, B.J. A Barrier to lateral diffusion in the cleavage furrow of dividing mammalian cells. **Current Biology - Cell**, v.14, p.1002-6, 2004.

33 FIELD, C.M.; KELLOGG, D. Septins: Cytoskeletal polymers or signalling GTPases? **Trends in Cell Biology**, v.9, n.10, p.387-94, 1999.

34 MOSTOWY, S.; COSSART, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.13, n.3, p.183-94, 2012.

35 XUE, J.; WANG, X.; MALLADI, C.S.; KINOSHITA, M.; MILBURN, P.J.; LENGYEL, I.; ROSTAS, J.A.P.; ROBINSON, P.J. Phosphorylation of a new brain-specific septin, G-septin, by cGMP- dependent protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.14, p.10047-56, 2000.

36 TADA, T.; SIMONETTA, A.; BATTERTON, M.; KINOSHITA, M.; EDBAUER, D.; SHENG, M. Role of septin cytoskeleton in spine morphogenesis and dendrite development in neurons. **Current Biology Cell**, v.17, n.20, p.1752-8, 2007.

37 IHARA, M.; KINOSHITA, A.; YAMADA, S.; TANAKA, H.; TANIGAKI, A.; KITANO, A.; GOTO, M.; OKUBO, K.; NISHIYAMA, H.; OGAWA, O.; TAKAHASHI, C.; ITOHARA, S.; NISHIMUNE, Y.; NODA, M.; KINOSHITA, M. Cortical organization by the septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa. **Developmental Cell**, v.8, n.3, p.343-52, 2005.

38 KUO, Y-C.; SHEN, Y-R.; CHEN, H-I.; LIN, Y-H.; WANG, Y-Y.; CHEN, Y-R.; WANG, C-Y.; KUO, P-L. SEPT12 orchestrates the formation of mammalian sperm annulus by organizing core octameric complexes with other SEPT proteins. **Journal of Cell Science**, v.128, n.5, p.923-34, 2015.

39 BEITES, C.L.; XIE, H.; BOWSER, R.; TRIMBLE, W.S. The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis. **Nature Neuroscience**, v.2, n.5, p.434-9, 1999.

40 CHIH, B.; LIU, P.; CHINN, Y.; CHALOUNI, C.; KOMUVES, L.G.; HASS, P.E.; SANDOVAL, W.; PETERSON, A.S. A ciliopathy complex at the transition zone protects the cilia as a privileged membrane domain. **Nature Cell Biology**, v.14, n.1, p.61-72, 2011.

41 KIM, S.K.; SHINDO, A.; PARK, T.J.; OH, E.C.; GHOSH, S.; GRAY, R.S.; LEWIS, R.A.; JOHNSON, C.A.; ATTIE-BITTACH, T.; KATSANIS, N.; WALLINGFORD, J.B. Planar cell polarity acts through septins to control collective cell movement and ciliogenesis. **Science**, v.329, n.5997, p.1337-40, 2010.

42 MOSTOWY, S.; BONAZZI, M.; HAMON, M.A.; THAM, T.N.; MALLET, A.; LELEK, M.; GOUIN, E.; DEMANGEL, C.; BROSCHE, R.; ZIMMER, C.; SARTORI, A.; KINOSHITA, M.; LECUIT, M.; COSSART, P. Entrapment of intracytosolic bacteria by septin cage-like structures. **Cell Host & Microbe**, v.8, n.5, p.433-44, 2010.

43 HUANG, Y-W.; YAN, M.; COLLINS, R.F.; DICICCIO, J.E.; GRINSTEIN, S.; TRIMBLE, W.S. Mammalian septins are required for phagosome formation. **Molecular Biology of the Cell**, v.19, n.4, p.1717-26, 2008.

44 KINOSHITA, M. Diversity of septin scaffolds. **Current Opinion in Cell Biology**, v.18, n.1, p.54-60, 2006.

45 FIELD, C.M.; AL-AWAR, O.; ROSENBLATT, J.; WONG, M.L.; ALBERTS, B.; MITCHISON, T.J. A Purified drosophila septin complex forms filaments and exhibits gtpase activity. **Journal of Cell Biology**, v.133, n.3, p.605-16, 1996.

46 FRAZIER, J.A.; WONG, M.L.; LONGTINE, M.S.; PRINGLE, J.R.; MANN, M.; MITCHISON, T.J.; FIELD, C. Polymerization of purified yeast septins: evidence that organized filament arrays may not be required for septin function. **Journal of Cell Biology**, v.143, n.3, p.737-49, 1998.

47 ZHANG, J.; KONG, C.; XIE, H.; MCPHERSON, P.S.; GRINSTEIN, S.; TRIMBLE, W.S. Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. **Current Biology Cell**, v.9, n.24, p.1458-67, 1999.

48 CASAMAYOR, A.; SNYDER, M. Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and function. **Molecular and Cell Biology**, v.23, n.8, p.2762-77, 2003.

49 GARCIA, W.; ULIAN DE ARAUJO, A.P.; DE OLIVEIRA NETO, M.; BALLESTERO, M.R.M.; POLIKARPOV, I.; TANAKA, M.; TANAKA, T.; GARRATT, R.C. Dissection of a human septin: Definition and characterization of distinct domains within human SEPT4. **Biochemistry**, v.45, n.46, p.13918-31, 2006.

50 VETTER, I.R.; WITTINGHOFER, A. The Guanine nucleotide – binding switch in three dimensions. **Science**, v.294, p.1299-305, 2001.

51 SIRAJUDDIN, M.; FARKASOVSKY, M.; ZENT, E.; WITTINGHOFER, A. GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.106, n.39, p.16592–7, 2009.

52 BOURNE, H.R.; SANDERS, D.A.; MCCORMICK, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. **Nature**, v.349, n.6305, p.117-27, 1991.

53 MACEDO, J.N.; VALADARES, N.F.; MARQUES, I.; FERREIRA, F.M.; DAMALIO, J.C.P.; PEREIRA, H.M.; GARRATT, R.C.; ARAUJO, A.P.U. The structure and properties of septin 3: a possible missing link in septin filament formation. **Biochemical Journal**, v.450, n.1, p95-105, 2013.

54 VERSELE, M.; GULLBRAND, B.; SHULEWITZ, M.J.; CID, V.J.; BAHMANYAR, S.; CHEN, R.E.; BARTH, P.; ALBER, T.; THORNER, J. Protein–protein interactions governing septin heteropentamer assembly and septin filament organization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, v.15, p.4568-83, 2004.

55 SIRAJUDDIN, M. **Structural studies on mammalian septins – new insights into filament formation**. 2007.123p. PhD (Thesis) - Universitat Dortmund, Dortmund, 2007.

56 ZENT, E.; VETTER, I.; WITTINGHOFER A. Structural and biochemical properties of Sept7, a unique septin required for filament formation. **Biological Chemistry**, v.392, n.8-9, p.791-7, 2011.

57 DE ALMEIDA MARQUES, I.; VALADARES, N.F.; GARCIA, W.; DAMALIO, J.C.P.; MACEDO, J.N.A.; DE ARAÚJO, A.P.U.; BOTELLO, C.A.; ANDREU, J.M.; GARRATT, R.C. Septin C-Terminal domain interactions: implications for filament stability and assembly. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v.62,n.2, p.317-28, 2012.

58 DE ALMEIDA MARQUES, I. **Estudos estruturais de septinas: explorando interações entre subunidades de filamentos de septinas humanas**. 2010. 148p. Tese (Doutorado em Física Biomolecular) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

59 HALL, P.A.; JUNG, K.; HILLAN, K.J.; RUSSELL, S.E.H. Expression profiling the human septin gene family. **Journal of Pathology**, v.206, n.3, p.269-78, 2005.

60 PETERSON, E.A.; KALIKIN, L.M.; STEELS, J.D.; ESTEY, M.P.; TRIMBLE, W.S.; PETTY, E.M. Characterization of a SEPT9 interacting protein, SEPT14, a novel testis-specific septin. **Mammalian Genome**, v.18, n.11, p.796-807, 2007.

61 MEGONIGAL, M.D.; RAPPAPORT, E.F.; JONES, D.H.; WILLIAMS, T.M.; LOVETT, B.D.; KELLY K.M.; LEROU, P.H.; MOULTON, T.; BUDARF, M.L.; FELIX, C.A. t(11;22)(q23;q11.2) In acute myeloid leukemia of infant twins fuses MLL with hCDCrel, a cell division cycle gene in the genomic region of deletion in DiGeorge and velocardiofacial syndromes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, n.11, p.6413-8, 1998.

62 ONO, R.; TAKI, T.; TAKETANI, T.; KAWAGUCHI, H.; TANIWAKI, M.; OKAMURA, T.; KAWA, K.; HANADA, R.; KOBAYASHI, M.; HAYASHI, Y. SEPTIN6, a human homologue to mouse Septin6, is fused to MLL in infant acute myeloid leukemia with complex chromosomal abnormalities involving 11q23 and Xq24. **Cancer Research**, v.62, n.2, p.333-7, 2002.

63 KOJIMA, K.; SAKAI, I.; HASEGAWA, A.; NIIYA, H.; AZUMA, T.; MATSUO, Y.; FUJII, N.; TANIMOTO, M.; FUJITA, S. FLJ10849, a septin family gene, fuses MLL in a novel leukemia cell line CNLBC1 derived from chronic neutrophilic leukemia in

transformation with t(4;11)(q21;q23). **Leukemia Nature**, v.18, n.5, p.998-1005, 2004.

64 KALIKIN, L.M.; SIMS, H.L.; PETTY, E.M. Genomic and expression analyses of alternatively spliced transcripts of the MLL septin-like fusion gene (MSF) that map to a 17q25 region of loss in breast and ovarian tumors. **Genomics**, v.63, n.2, p.165-72, 2000.

65 MONTAGNA, C.; LYU, M.; HUNTER, K.; LUKES, L.; LOWTHER, W.; REPERT, T.; HISSONG, B.; WEAVER, Z.; RIED, T. The Septin 9 (MSF) gene is amplified and overexpressed in mouse mammary gland adenocarcinomas and human breast cancer cell lines. **Cancer Research**, v.63, p.2179–87, 2003.

66 BURROWS, J.F.; CHANDULOY, S.; MCILHATTON, M.A.; NAGAR, H.; YEATES, K.; DONAGHY, P.; PRICE, J.; GODWIN, A.K.; JOHNSTON, P.G.; RUSSELL, S.E.H. Altered expression of the septin gene, sept9, in ovarian neoplasia. **Journal of Pathology**, v.201, n.4, p.581-8, 2003.

67 KIM, D-S.; HUBBARD, S-L.; PERAUD, A.; SALHIA, B.; SAKAI, K.; RUTKA, J.T. Analysis of mammalian septin expression in human malignant brain tumors. **Neoplasia**, v.6, n.2, p.168-78, 2004.

68 KINOSHITA, A.; KINOSHITA, M.; AKIYAMA, H.; TOMIMOTO, H.; AKIGUCHI, I.; KUMAR, S.; NODA, M.; KIMURA, J. Identification of septins in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. **American Journal of Pathology**, v.153, n.5, p.1551-60, 1998.

69 IHARA, M.; TOMIMOTO, H.; KITAYAMA, H.; MORIOKA, Y.; AKIGUCHI, I.; SHIBASAKI, H.; NODA, M.; KINOSHITA, M. Association of the cytoskeletal GTP-binding protein Sept4/H5 with cytoplasmic inclusions found in Parkinson's disease and other synucleinopathies. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.26, p.24095-102, 2003.

70 CHEON, M.S.; FOUNTOULAKIS, M.; DIERSSEN, M.; FERRERES, J.C.; LUBEC, G. Expression profiles of proteins in fetal brain with Down syndrome. **Journal of Neural Transmission Supplementa**, v.61, p.311-9, 2001.

71 ENGIDAWORK, E.; GULESSERIAN, T.; FOUNTOULAKIS, M.; LUBEC, G. Aberrant protein expression in cerebral cortex of fetus with Down syndrome. **Neuroscience**, v.122, n.1, p.145-54, 2003.

72 MENDOZA, M.; HYMAN, A.A.; GLOTZER, M. GTP binding induces filament assembly of a recombinant septin. **Current Biology Cell**, v.12, n.21, p.1858-63, 2002.

73 ZENT, E.; WITTINGHOFER, A. Human septin isoforms and the GDP-GTP cycle.

Biological Chemistry, v.395, n.2, p.169-80, 2014.

74 LOW, C.; MACARA, I.G. Structural analysis of septin 2, 6, and 7 complexes. **Journal of Biological Chemistry**, v.281, n.41, p.30697-706, 2006.

75 SHEFFIELD, P.J.; OLIVER, C.J.; KREMER, B.E.; SHENG, S.; SHAO, Z.; MACARA, I.G. Borg/Septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.5, p.3483-8, 2003.

76 SIRAJUDDIN, M.; FARKASOVSKY, M.; HAUER, F.; KÜHLMANN, D.; MACARA, I.G.; WEYAND, M.; STARK, H.; WITTINGHOFFER, A. Structural insight into filament formation by mammalian septins. **Nature**, v.449, p.311-7, 2007.

77 HUANG, Y.W.; SURKA, M.C.; REYNAUD, D.; PACE-ASCIAK, C.; TRIMBLE, W.S. GTP binding and hydrolysis kinetics of human septin 2. **FEBS Journal**, v.273, n.14, p.3248-60, 2006.

78 GARCIA, W.; DE ARAÚJO, A.P.U.; LARA, F.; FOGUEL, D.; TANAKA, M.; TANAKA, T.; GARRATT, R.C. An intermediate structure in the thermal unfolding of the GTPase domain of human septin 4 (SEPT4/bradeion- β) forms amyloid-like filaments in vitro. **Biochemistry**, v.46, n.39, p.11101-9, 2007.

79 ZERAIK, A.E.; PEREIRA, H.M.; SANTOS, Y. V.; BRANDÃO-NETO, J.; SPOERNER, M.; SANTOS, M.S.; COLNAGO, L.A.; GARRATT, R.C.; ARAÚJO, A.P.U.; DEMARCO, R. Crystal structure of a *Schistosoma mansoni* septin reveals the phenomenon of strand slippage in septins dependent on the nature of the bound nucleotide. **Journal of Biological Chemistry**, v.289, n.11, p.7799-811, 2014.

80 SERRÃO, V.H.B.; ALESSANDRO, F.; CALDAS, V.E.A.; MARAL, R.L.; PEREIRA, H.D.; THIEMANN, O.H.; GARRATT, R.C. Promiscuous interactions of human septins: the GTP binding domain of SEPT7 forms filaments within the crystal. **FEBS Letters**, v.585, n.24, p.3868-73, 2011.

81 KINOSHITA, M.; FIELD, C.M.; COUGHLIN, M.L.; STRAIGHT, A.F.; MITCHISON, T.J. Self- and actin-templated assembly of mammalian septins. **Developmental Cell**, v.3, n.6, p.791-802, 2002.

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

83 KIM, M.S.; FROESE, C.D.; ESTEY, M.P.; TRIMBLE, W.S. SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent

functions in abscission. **Journal of Cell Biology**, v.195, n.5, p.815-26, 2011.

84 SANDROCK, K.; BARTSCH, I.; BLÄSER, S.; BUSSE, A.; BUSSE, E.; ZIEGER B. Characterization of human septin interactions. **Biological Chemistry**, v.392, n.8-9, p.751-61, 2011.

85 BLASER, S.; JERSCH, K.; HAINMANN, I.; WUNDERLE, D.; ZGAGA-GRIESZ, A.; BUSSE, A.; ZIEGER, B. Human septin - septin interaction: CDCrel-1 partners with KIAA0202. **FEBS Journal**, v.519, p.169-72, 2002.

86 BLASER, S.; JERSCH, K.; HAINMANN, I.; ZIEGER, W.; WUNDERLE, D.; BUSSE, A.; ZIEGER, B. Isolation of new splice isoforms, characterization and expression analysis of the human septin SEPT8 (KIAA0202). **Gene**, v.312, p.313-20, 2003.

87 MARTINEZ, C.; SANJUAN, M.A.; DENT, J.A.; KARLSSON, L.; WARE, J. Human septin-septin interactions as a prerequisite for targeting septin complexes in the cytosol. **Biochemical Journal**, v.382, p.783-91, 2004.

88 HANAHAN, D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v.166, n.4, p.557-80, 1983.

89 SHAPIRO, A.L.; VIÑUELA, E.; MAIZEL, J.V. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.28, n.5, p.815-20, 1967.

90 FERRÉ-D'AMARÉ, A.R.; BURLEY, S.K. Dynamic light scattering in evaluating crystallizability of macromolecules. **Methods in Enzymology**, v.276, p.157-66, 1997.

91 MALVERN INSTRUMENTS. **Dynamic light scattering** : an introduction in 30 minutes. 2014.

Disponível em: <<http://www3.nd.edu/~rroeder/ame60647/slides/dls.pdf>>. Acesso em: 20 abril 2016.

92 BRUCE, J.; BERNE, R.P. **Dynamic light scattering**: with applications to chemistry, biology, and physics. New York: Wiley international, 1976.

93 CANTOR, C.R.; SCHIMMEL, P.R. **Biophysical chemistry**: Part II - techniques for the study of biological structure and function. New York: Freeman & Company, 1980.

94 BORGES, J.C.; RAMOS, C.H.I. Analysis of molecular targets of mycobacterium tuberculosis by analytical ultracentrifugation. **Current Medicinal Chemistry**, v.18, p.1276-85, 2011.

- 95 SCHUCK, P. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. **Biophysical Journal Cell**, v.78, n.3, p.1606-19, 2000.
- 96 LEBOWITZ, J.; LEWIS, M.S.; SCHUCK, P. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review. **Protein Science**, v.11, n.9, p.2067-79, 2002.
- 97 SECKLER, R.; WU, G-M.; TIMASHEFF, S.N. Interactions of Tubulin with Guanylyl-(P-y-Methylene)diphosphonate: formation and assembly of a stoichiometric complex. **Journal of Biological Chemistry**, v.265, n.13, p.7655-61, 1990.
- 98 JANIN, J. Protein-protein recognition. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v.64, n.2, p.145-66, 1995.
- 99 DEMCHENKO, A.P. Recognition between flexible protein molecules: Induced and assisted folding. **Journal of Molecular Recognition**, v.14, n.1, p.42-61, 2001.
- 100 DU, X.; LI, Y.; XIA, Y-L.; AI, S-M.; LIANG, J.; SANG, P.; JI, X-L.; LIU, S-Q. Insights into protein–ligand interactions: mechanisms, models, and methods. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, n.2, p.144, 2016.
- 101 JERABEK-WILLEMSSEN, M.; ANDRÉ, T.; WANNER, R.; ROTH, H.M.; DUHR, S.; BAASKE, P.; BREITSPRECHER, D. MicroScale thermophoresis: interaction analysis and beyond. **Journal of Molecular Structure**, v. 1077, p.101-113, 2014.
- 102 SEIDEL, S.A.I.; DIJKMAN, P.M.; LEA, W.A.; VAN DEN BOGAART, G.; JERABEK-WILLEMSSEN, M.; LAZIC, A.; JOSEPH, J.S.; SRINIVASAN, P.; BAASKE, P.; SIMEONOV, A.; KATRITCH, I.; MELO, F.A.; LADBURY, J.E.; SCHREIBER, G.; WATTS, A.; BRAUN, D. DUHR, S. Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. **Methods**, v.59, n.3, p.301-15, 2013.
- 103 MILES, A.J.; WALLACE, B.A. **Circular dichroism spectroscopy for protein characterization: pharmaceutical applications**. London: Elsevier, 2014.
- 104 NIESEN, F.H.; BERGLUND, H.; VEDADI, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Nature Protocols**, v.2, n.9, p.2212-21, 2007.
- 105 Schellman, J.A. Temperature, stability, and the hydrophobic interaction. **Biophysical Journal**, v.73, n.6, p.2960-4, 1997.
- 106 BOIVIN, S.; KOZAK, S.; MEIJERS, R. Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens. **Protein Expression and Purification**, v.91, n.2, p.192-206, 2013.

- 107 LO, M.C.; AULABAUGH, A.; JIN, G.; COWLING, R.; BARD, J.; MALAMAS, M.; ELLESTAD, G. Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. **Analytical Biochemistry**, v.332, n.1, p.153-9, 2004.
- 108 ERICSSON, U.B.; HALLBERG, B.M.; DETITTA, G.T.; DEKKER, N.; NORDLUND, P. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. **Analytical Biochemistry**, v.357, n.2, p.289-98, 2006.
- 109 GREENFIELD, N.J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. **Nature Protocols**, v.1, n.6, p.2527-35, 2009.
- 110 ANFINSEN, C.B. Principles that govern the folding of protein chains. **Science**, v.181, n.4096, p.223-30, 1973.
- 111 SÁNCHEZ, R.; SALI, A. Large-scale protein structure modeling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, n.23, p.13597-602, 1998.
- 112 ROY, A.; ZHANG, Y. Protein structure prediction. **Encyclopedia of Life Sciences**, p.1-5, 2008.
- 113 DORN, M.; BARBACHAN, M.; BURIOL, L.S.; LAMB, L.C. Three-dimensional protein structure prediction: Methods and computational strategies. **Computational Biology and Chemistry**, v.53, p.251-76, 2014.
- 114 BAKER, D.; SALI, A. Protein structure prediction and structural genomics. **Science**, v.294, n.5540, p.93-6, 2001.
- 115 KOPP, J.; SCHWEDE, T. Automated protein structure homology modeling: a progress report. **Pharmacogenomics**, v.5, n.4, p.405-16, 2004.
- 116 FISHER, C.L.; PEI, G.K. Modification of a PCR-based site-directed mutagenesis method. **Biotechniques**, v.23, n.4, p.570-4, 1997.
- 117 HESTERBERG, L.K.; LEE, J.C.; ERICKSON, H.P. Structural properties of an active form of rabbit muscle phosphofructokinase. **Journal of Biological Chemistry**, v.256, n.18, p.9724-30, 1981.
- 118 GARCÍA DE LA TORRE, J.; HUERTAS, M.L.; CARRASCO, B. Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure. **Biophysical Journal**, v.78, n.2, p.719-30, 2000.

119 DING, X.; YU, W.; LIU, M.; SHEN, S.; CHEN, F.; CAO, L.; WAN, B.; YU, L. Molecules and GTP binding is required for SEPT12 to form filaments and to interact with SEPT11. **Molecules and Cells**, v.25, n.3, p.385-9, 2007.

120 MORAIS, S. T. B. **Estudos estruturais da SEPT8 e análise de suas interações com SEPT5 e SEPT7**. 2014. 85p. Dissertação (Mestrado em Física Biomolecular) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

121 HOFF, C. **Estudos estruturais da septina humana SEPT11**. 2008. 125p. Dissertação (Mestrado em Física Biomolecular) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

122 HOVMÖLLER, S.; ZHOU, T.; OHLSON, T. Conformations of amino acids in proteins. **Acta Crystallographica D**, v.58, n.5, p.768-76, 2002.

123 REINHARD, L.; MAYERHOFER, H.; GEERLOF, A.; MUELLER-DIECKMANN, J.; WEISS, M.S. Optimization of protein buffer cocktails using Thermofluor. **Acta Crystallographica F**, v.69, n.2, p.209-14, 2013.

124 GLADFELTER, A.S.; PRINGLE, J.R.; LEW, D.J. The septin cortex at the yeast mother-bud neck. **Current Opinion in Microbiology**, v.4, n.6, p.681-9, 2001.

125 BISHOP, O.T.; DE BEER, T.A.P.; JOUBERT, F. Protein homology modelling and its use in South Africa. **South African Journal of Science**, v.104, p.2-6, 2008.